

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI I ISPITIVANJE**  
**SPOSOBNOSTI INHIBICIJE KOLINESTERAZA VODENOG EKSTRAKTA I**  
**ETERIČNOG ULJA CHIA SJEMENKI**

**DIPLOMSKI RAD**

**KORNELIJA KREJČIR**

**Matični broj: 72**

**Split, srpanj 2018.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ ORGANSKE KEMIJE I BIOKEMIJE**

**ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI I ISPITIVANJE**  
**SPOSOBNOSTI INHIBICIJE KOLINESTERAZA VODENOG EKSTRAKTA I**  
**ETERIČNOG ULJA CHIA SJEMENKI**

**DIPLOMSKI RAD**

**KORNELIJA KREJČIR**

**Matični broj: 72**

**Split, srpanj 2018.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**

**DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY AND  
CHOLINESTERASES INHIBITORY ACTIVITY OF CHIA SEEDS WATER  
EXTRACT AND ESSENTIAL OILS**

**GRADUATE THESIS**

**KORNELIJA KREJČIR**

**Parent number: 72**

**Split, July 2018.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Diplomski studij organske kemije i biokemije

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta**

**Mentor:** Doc. dr. sc. Franko Burčul

### Određivanje antioksidacijske aktivnosti i ispitivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza vodenog ekstrakta i eteričnog ulja chia sjemenki

KORNELIJA KREJČIR, 72

**Sažetak:** Chia (*Salvia hispanica* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice usnatica (*Lamiaceae*), podrijetlom iz Meksika i Gvatemale. Zbog svojeg zanimljivog kemijskog sastava, sjemenke ove biljke postale su tema brojnih znanstvenih istraživanja te se time njihova upotreba proširila i u Europu. Ono što je najznačajnije u kemijskom sastavu chia sjemenki je visok udio  $\omega$ -3-masnih kiselina i prehrambenih vlakana za koje je dokazano kako imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. U usporedbi s ostalim sjemenkama moglo bi se reći kako imaju gotovo idealan omjer  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3-masnih kiselina, uz lanene sjemenke koje sadrže nešto veći udio  $\omega$ -3-masnih kiselina. Također sadrže i visok udio vlakana, najčešće između 34 i 40 g na 100 g sjemenki, što u potpunosti zadovoljava preporuke za unos vlakana. Udio proteina u chia sjemenkama varira od 15-23%, što je više u odnosu na ostale žitarice poput pšenice, riže, kukuruza i ječma koje sadrže manje od 16% proteina. U većem udjelu sadrže vitamine B skupine uz prisutnost antioksidacijskih vitamina (C, A i E) u manjim udjelima. Osim toga, sve se više pažnje pridaje antioksidansima prisutnim u sjemenkama, prvenstveno fenolnim spojevima.

Antioksidansi su tvari koje usporavaju ili sprječavaju nepoželjne reakcije oksidacije drugih tvari uzrokovane djelovanjem slobodnih radikala u našem organizmu. Najzastupljeniji antioksidansi u chia sjemenkama spadaju u skupine fenolnih kiselina i flavonoida.

Cilj ovog rada bio je određivanje sadržaja ukupnih fenola, određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenog ekstrakta, te identifikacija spojeva u eteričnom ulju chia sjemenki (*Salvia hispanica* L.) kao i ispitivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza.

Kao glavni spoj eteričnog ulja ističe se bis(2-etilheksil) ester adipinske kiseline. Pokazana je relativno dobra antioksidacijska aktivnost vodenog ekstrakta, dok je eterično ulje slabije inhibiralo enzim butirilkolinesterazu.

**Ključne riječi:** chia sjemenke, fenoli, antioksidansi, inhibicija, kolinesteraza

**Rad sadrži:** 43 stanice, 17 slika, 9 tablica, 33 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek - član
3. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član - mentor

**Datum obrane:** 6. srpanj 2018.

**Rad je tiskan u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## GRADUATE THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Graduate study of organic chemistry and biochemistry

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3.

**Mentor:** Franko Burčul, PhD, assistant professor

**Determination of antioxidant activity and cholinesterases inhibitory activity of chia seeds  
water extract and essential oil**  
KORNELIJA KREJČIR, 72

**Abstract:** Chia (*Salvia hispanica* L.) is a one-year-old herbaceous plant from *Lamiaceae*, originating in Mexico and Guatemala. Because of its interesting chemical composition, the seeds of this plant have become the subject of numerous scientific researches and their use has spread to Europe as well. What is most significant in the chemical composition of chia seeds is the high content of  $\omega$ -3 fatty acids and dietary fiber which has been shown to have a positive effect on human health. Compared with other seeds, it can be said that they have almost the ideal ratio of  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 fatty acids, with flax seeds containing slightly larger  $\omega$ -3 fatty acids. They also contain a high fiber content, most commonly between 34 and 40 g per 100 g of seeds, which fully meets the fiber input recommendations. The percentage of protein in chia seeds ranges from 15 to 23%, which is higher than other cereals such as wheat, rice, corn and barley containing less than 16% of protein. Most of the vitamin B content is present in the presence of antioxidant vitamins (C, A and E) in small proportions. Additionally, antioxidants are increasingly present in seeds, primarily phenolic compounds.

Antioxidants are substances which slow down or prevent unwanted oxidation reactions of other substances caused by the action of free radicals in our body. The most common antioxidants in chia seeds are in the groups of phenolic acids and flavonoids.

The aim of this study was to determine the content of total phenols, determine the antioxidant activity of the aqueous extract and identify the compounds in essential oil of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) as well as the ability to inhibit cholinesterase.

The main compound of the essential oil is the bis (2-ethylhexyl) ester of adipic acid ester. A relatively good antioxidant activity of the aqueous extract was shown, while the essential oil had a lower inhibitory effect on the enzyme butyrylcholinesterase

**Keywords:** chia seeds, phenols, antioxidants, inhibition, cholinesterase

**Thesis contains:** 43 pages, 17 figures, 9 tables, 33 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Ivica Blažević, PhD. Associate professor - chair person
2. Mario Nikola Mužek, PhD, Assistant professor - member
3. Franko Burčul, PhD, Assistant professor - supervisor

**Defence date:** July 6, 2018

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Franka Burčula, u razdoblju od ožujka do srpnja 2018. godine.*

Rad je financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost projektom: *"Istraživanje bioaktivnih spojeva iz dalmatinskog bilja: njihov antioksidacijski karakter i utjecaj na enzimsku inhibiciju i zdravlje" IP-2014-09-6897.*

*Iskreno zahvaljujem doc. dr. sc. Franku Burčulu, koji mi je pomogao da uspješno odradim eksperimentalni rad te mi pomogao svojim stručnim savjetima i sugestijama tijekom pisanja i obrade podataka diplomskog rada.*

*Posebno se zahvaljujem obitelji i prijateljima na potpori i razumijevanju tijekom studiranja.*



## **ZADATAK DIPLOMSKOG RADA**

1. *Priprava vodenog ekstrakta i eteričnog ulja chia sjemenki (Salvia hispanica L.).*
2. *Određivanje sadržaja ukupnih fenola primjenom Folin-Ciocalteu metode.*
3. *Identifikacija spojeva u eteričnom ulju chia sjemenki (Salvia hispanica L.) GC-MS tehnikom.*
4. *Određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenog ekstrakta biljke, DPPH i FRAP metodom.*
5. *Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE) metodom po Ellmanu.*

## SAŽETAK

Chia (*Salvia hispanica* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice usnatica (*Lamiaceae*), podrijetlom iz Meksika i Gvatemale. Zbog svojeg zanimljivog kemijskog sastava, sjemenke ove biljke postale su tema brojnih znanstvenih istraživanja te se time njihova upotreba proširila i u Europu. Ono što je najznačajnije u kemijskom sastavu chia sjemenki je visok udio  $\omega$ -3-masnih kiselina i prehrambenih vlakana za koje je dokazano kako imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. U usporedbi s ostalim sjemenkama moglo bi se reći kako imaju gotovo idealan omjer  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3-masnih kiselina, uz lanene sjemenke koje sadrže nešto veći udio  $\omega$ -3-masnih kiselina. Također sadrže i visok udio vlakana, najčešće između 34 i 40 g na 100 g sjemenki, što u potpunosti zadovoljava preporuke za unos vlakana. Udio proteina u chia sjemenkama varira od 15-23%, što je više u odnosu na ostale žitarice poput pšenice, riže, kukuruza i ječma koje sadrže manje od 16% proteina. U većem udjelu sadržavaju vitamine B skupine uz prisutnost antioksidacijskih vitamina (C, A i E) u manjim udjelima. Osim toga, sve se više pažnje pridaje antioksidansima prisutnim u sjemenkama, prvenstveno fenolnim spojevima.

Antioksidansi su tvari koje usporavaju ili sprječavaju nepoželjne reakcije oksidacije drugih tvari uzrokovane djelovanjem slobodnih radikala u našem organizmu. Najzastupljeniji antioksidansi u chia sjemenkama spadaju u skupine fenolnih kiselina i flavonoida.

Cilj ovog rada bio je određivanje sadržaja ukupnih fenola, određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenog ekstrakta, te identifikacija spojeva u eteričnom ulju chia sjemenki (*Salvia hispanica* L.) kao i ispitivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza.

Kao glavni spoj eteričnog ulja ističe se bis(2-etilheksil) ester adipinske kiseline. Pokazana je relativno dobra antioksidacijska aktivnost vodenog ekstrakta, dok je eterično ulje slabije inhibiralo enzim butirilkolinesterazu.

**Ključne riječi:** chia sjemenke, fenoli, antioksidansi, inhibicija, kolinesteraza

## SUMMARY

Chia (*Salvia hispanica* L.) is a one-year-old herbaceous plant from Lamiaceae, originating in Mexico and Guatemala. Because of its interesting chemical composition, the seeds of this plant have become the subject of numerous scientific researches and their use has spread to Europe as well. What is most significant in the chemical composition of chia seeds is the high content of  $\omega$ -3 fatty acids and dietary fiber which has been shown to have a positive effect on human health. Compared with other seeds, it can be said that they have almost the ideal ratio of  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 fatty acids, with flax seeds containing slightly larger  $\omega$ -3 fatty acids. They also contain a high fiber content, most commonly between 34 and 40 g per 100 g of seeds, which fully meets the fiber input recommendations. The percentage of protein in chia seeds ranges from 15 to 23%, which is higher than other cereals such as wheat, rice, corn and barley containing less than 16% of protein. Most of the vitamin B content is present in the presence of antioxidant vitamins (C, A and E) in small proportions. Additionally, antioxidants are increasingly present in seeds, primarily phenolic compounds.

Antioxidants are substances which slow down or prevent unwanted oxidation reactions of other substances caused by the action of free radicals in our body. The most common antioxidants in chia seeds are in the groups of phenolic acids and flavonoids.

The aim of this study was to determine the content of total phenols, determine the antioxidant activity of the aqueous extract and identify the compounds in essential oil of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) as well as the ability to inhibit cholinesterase.

The main compound of the essential oil is the bis (2-ethylhexyl) ester of adipic acid ester. A relatively good antioxidant activity of the aqueous extract was shown, while the essential oil had a lower inhibitory effect on the enzyme butyrylcholinesterase.

**Key words:** chia seeds, phenols, antioxidants, inhibition, cholinesterase

# SADRŽAJ

1. Opći dio .....	2
1.1. Povijest chia sjemenki.....	2
1.2. Botanički opis biljke .....	3
1.3. Kemijski sastav chia sjemenki .....	5
1.3.1. Lipidi .....	7
1.3.2. Proteini.....	8
1.3.3. Vlakna.....	8
1.3.4. Antioksidansi .....	9
1.3.5. Vitamini i minerali.....	10
1.4. Fizikalno-kemijska svojstva chia sjemenki .....	11
2. Uporaba chia sjemenki u industriji .....	11
2.1. Prehrambena industrija .....	11
2.2. Farmaceutska industrija .....	13
3. Pregled korištenih metoda.....	14
3.1. Metode izolacije.....	14
3.1.1. Ekstrakcija .....	14
3.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija .....	15
3.1.3. Hidrodestilacija u modificiranoj aparaturi po Clevengeru .....	15
3.2. Spektrofotometrijske metode .....	16
3.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola primjenom Folin-Ciocalteu metode.....	17
3.2.2. Plinska kromatografija-masena spektrometrija .....	18
3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzorka metodom vezivanja DPPH radikala .....	19
3.2.4. Metoda mjerenja redukcijskog potencijala.....	20
3.2.5. Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze metodom po Ellmanu .....	20
4. Eksperimentalni dio .....	22
4.1. Biljni materijal .....	22
4.2. Aparatura i pribor.....	23
4.3. Priprema vodenog ekstrakta biljke.....	24
4.4. Hidrodestilacija u modificiranoj aparaturi po Clevengeru.....	24
4.5. Priprema otopina potrebnih koncentracija .....	25
4.6. Određivanje ukupnih fenola po Folin-Ciocalteu.....	26
4.7. Određivanje kemijskog sastava eteričnog ulja spregnutom tehnikom plinska kromatografija-masena spektrometrija .....	26
4.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti vezivanjem slobodnog radikala DPPH metodom....	28

4.9.	Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom .....	28
4.10.	Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima AChE i BChE metodom po Ellmanu .....	29
5.	Rezultati .....	32
5.1.	Određivanje sadržaja ukupnih fenola primjenom Folin-Ciocalteu metode .....	32
5.2.	Određivanje kemijskog sastava eteričnog ulja spregnutom tehnikom plinska kromatografija-masena spektrometrija .....	33
5.3.	Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzorka DPPH metodom .....	34
5.4.	Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzorka FRAP metodom .....	35
5.5.	Sposobnost inhibicije enzima AChE mjerena metodom po Ellmanu .....	36
5.6.	Sposobnost inhibicije enzima BChE mjerena metodom po Ellmanu .....	36
6.	Rasprava .....	37
7.	Zaključak .....	39
8.	Literatura .....	41

## UVOD

Chia (*Salvia hispanica* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice usnatica (*Lamiaceae*), podrijetlom iz Meksika i Gvatemale, a njen plod, chia sjemenke, predstavljale su tradicionalnu namirnicu u prehrani starosjedilaca Amerike gdje su se osim u prehrani upotrebljavale i za pripremu lijekova i boja za ukrašavanje tijela. Iako su nakon španjolske kolonizacije bile gotovo zaboravljene, njihov uzgoj se održao do današnjeg dana.

Ono što je najznačajnije u kemijskom sastavu chia sjemenki je visok udio  $\omega$ -3-masnih kiselina i prehrambenih vlakana za koje je dokazano kako imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Također sadrže visok udio vlakana, najčešće između 34 i 40 g na 100 g sjemenki, što u potpunosti zadovoljava preporuke za unos vlakana. Udio proteina u chia sjemenkama varira od 15 do 23% te sadržavaju u većem udjelu vitamine B skupine uz prisutnost antioksidacijskih vitamina (C, A i E) u manjim udjelima.

Danas se chia sjemenke koriste u proizvodnji raznih prehrambenih proizvoda, poput pekarskih proizvoda, jogurta i sokova. Zbog svojih dobrih fizikalno-kemijskih svojstava imaju veliki potencijal za proširenje njihove uporabe u prehrambenoj industriji, naročito za proizvodnju novih funkcionalnih proizvoda. Osim toga, značajan je njihov povoljan utjecaj na zdravlje ljudi, što je osim tradicionalnih vjerovanja dokazano i znanstveno. Osim u prehrambenoj industriji sve se više istražuje korištenje chia sjemenki u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji te u prehrani životinja.

# 1. Opći dio

## 1.1. Povijest chia sjemenki

Naziv "chia" potječe od nahuatlanske riječi *chian* ili *chien* što znači "uljast", a švedski botaničar Carl Linnaeus nazvao je biljku *Salvia hispanica* L. jer ju je zamijenio s nativnom biljkom porijeklom iz Španjolske. Chia je prvenstveno bila prisutna na sušnim područjima koja se protežu od zapadnog Meksika do južne Gvatemale te je jedna od najstarijih biljaka koju su kultivirali Asteci. Chia sjemenke počele su se koristiti u ljudskoj prehrani već 3500. godine pr. Kr., a između 1500. i 900. godine pr. Kr. postale su jedna od glavnih sastojaka biljnog podrijetla u prehrani Asteka i Maja, odmah pored kukuruza, amaranta i graha.<sup>26</sup> Konzumirale su se u obliku cijelih sjemenki ili su se koristili brašno i ulje sjemenki. Osim što se koristilo u prehrani, ulje chia sjemenki upotrebljavalo se i u pripremi raznih lijekova te boja kojima su domoroci ukrašavali vlastita lica i tijela. Najčešći način pripreme chia sjemenki bilo je pečenje i mljevenje sjemenki kako bi se dobilo brašno zvano Chianpinolli koje se potom koristilo u pripremi tortilja i sličnih jela te se dodavalo u razne napitke poznatije pod nazivom Chianatoles.<sup>6</sup> Najpoznatiji tradicionalni napitak jest Chia fresca (svježa chia) koja se dobiva namakanjem chia sjemenki u vodi, a potom se dodaje voćni sok te se konzumira ohlađeno kao osvježavajući napitak.

Nakon španjolske kolonizacije Srednje Amerike došlo je do zabrane uzgoja chie, prvenstveno jer su je Asteci koristili u religioznim obredima. Chiu su zamijenile uvozne vrste biljaka poput pšenice i ječma, a zbog veoma dugog perioda zabrane uzgoja od oko 260 godina, chia je gotovo bila zaboravljena. Smatra se kako je chia opstala upravo zbog njenog tajnog uzgoja od strane Nahua, grupe plemena američkih Indijanaca koji su bili nastanjeni u Meksiku. Dugi niz godina uzgoj i konzumacija chie bili su ograničeni samo na području zemalja njenog podrijetla, sve dok se nisu intenzivirala istraživanja o važnosti esencijalnih masnih kiselina čime su chia sjemenke našle svoje mjesto i na europskom tržištu.

Ključno istraživanje zaslužno za promociju chia sjemenki i nova saznanja bilo je istraživanje započeto 1991. godine. Znanstvenici iz Sjedinjenih Američkih Država i Argentine proučavali su nutritivni sastav, uvjete uzgoja i ostale parametre chia sjemenki

s različitih područja Južne Amerike, a istraživanje je poznato pod nazivom "Northwestern-Argentina Regional Project".<sup>27</sup>

## 1.2. Botanički opis biljke

Chia (*Salvia hispanica* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice usnatica (*Lamiaceae*) te se prvenstveno uzgaja upravo zbog sjemenki koje se koriste u prehrani ljudi. Biljke iz porodice usnatica karakterizira visok udio eteričnih ulja, a u tu skupinu spadaju i poznati začini poput mente, ružmarina i origana.<sup>1</sup>

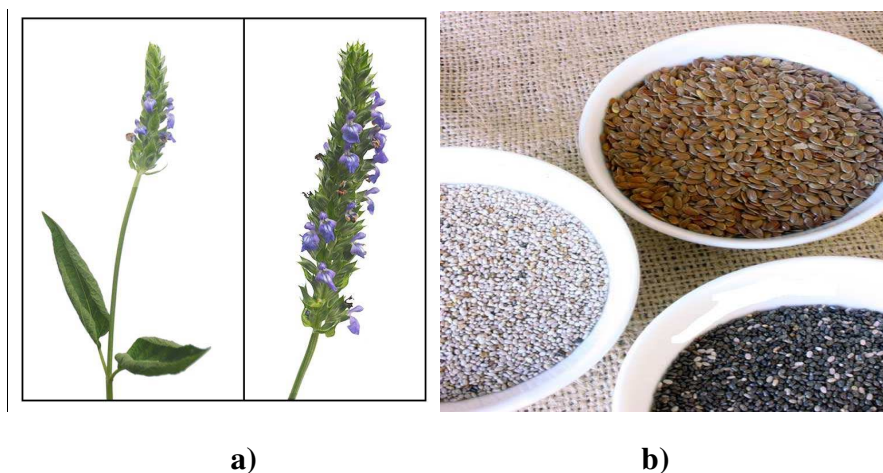
Taksonomske kategorije biljke su sljedeće:

Carstvo	<i>Plantae</i>
Odjeljak	<i>Magnoliophyta</i>
Pododjeljak	<i>Spermatophytina</i>
Razred	<i>Magnoliopsida</i>
Podrazred	<i>Asteridae</i>
Red	<i>Lamiales</i>
Porodica	<i>Lamiaceae</i>
Rod	<i>Salvia</i> L.
Vrsta	<i>S. hispanica</i> L.

Biljka chia cvate u ljetnim mjesecima, i to u srpnju i kolovozu, a njenom rastu pogoduju pjeskovita, suha tla te pretežno tropska i suptropska klima koju karakteriziraju duga i sušna ljeta te kratke i blage zime. Takva klima prisutna je u području oko ekvatora, gdje se chia najviše i uzgaja te u umjerenoj zoni prema polovima (Meksiko, područje Srednje i Južne Amerike te sjeverna Australija). Biljka raste većinom na planinskim područjima te ne cvate na mjestima gdje nije prisutno dovoljno sunčeve



svjetlosti. Danas su najveći proizvođači chia sjemenki Paragvaj (3985 tona godišnje), Argentina (2758 tona), Bolivija (2541 tona), Peru (1347 tona) i Meksiko (1025 tona). Stabljika chie može narasti do jednog metra visine, a listovi su ovalni, nazubljenih rubova i šiljatih vrhova, dužine 4-8 cm te širine 3-5 cm. Listovi sadrže eterična ulja koja štite biljku od raznih štetnika čime djeluju kao prirodni pesticidi, stoga prilikom uzgoja chie nije nužna uporaba kemikalija. Osim toga, moguća je ekstrakcija ulja iz listova chie koje se potom može koristiti kao sredstvo protiv raznih insekata. Cvjetovi su mali, bijele do ljubičaste boje te su skupljeni u klasove na vrhu stabljike.



**Slika 1.** Chia (*Salvia hispanica* L.): a) u cvatu<sup>27</sup> i b) sjemenke<sup>25</sup>

Sjemenke su vrlo sitne ( $1,87 \pm 0,1$  mm dužine,  $1,21 \pm 0,08$  mm širine), ovalnog oblika i glatke površine. Najčešća boja sjemenki je siva s crnim točkicama, međutim moguće su i kombinacije crne, sive, smeđe i bijele boje. Sastoje se od tri sloja: vanjski omotač, endosperm i klica. Ono što je karakteristično za chia sjemenke jest prisutnost polisaharida u vanjskom omotaču koji u kontaktu s vodom stvaraju želatinoznu ovojnicu (*engl.* mucilage) oko sjemenke. Smatra se kako je to svojstvo zapravo prilagodba biljke na sušne uvjete u kojima raste, čime se regulira gubitak vode iz sjemenki.<sup>2</sup>

### 1.3. Kemijski sastav chia sjemenki

Glavna karakteristika chia sjemenki upravo je njihov odličan kemijski sastav zbog kojeg danas postaju sve popularnija namirnica diljem svijeta. Kemijski sastav chia sjemenki vrlo često varira ovisno o području gdje su uzgajane što najviše utječe na udio proteina i masnih kiselina. Na varijabilnost kemijskog sastava sjemenki utječu okolišni faktori, klimatski uvjeti, pristupačnost nutrijenata, godina uzgoja i vrsta tla. Jedno od najvažnijih svojstava chia sjemenki jest izvanredan sastav masnih kiselina, od kojih većinski udio čine višestruko nezasićene masne kiseline, prvenstveno  $\omega$ -3-masne kiseline<sup>1</sup> (17,8 g/100 g) koje se povezuju s pozitivnim učincima na zdravlje ljudi. U Tablici 1 dan je prikaz udjela masnih kiselina i vidljiv je mali udio zasićenih masnih kiselina (3,3 g/100 g) u odnosu na višestruko nezasićene masne kiseline (23,7 g/100 g), stoga chia sjemenke mogu biti pogodna namirnica za prehranu osoba koje imaju problema s bolestima krvožilnog sustava.<sup>3</sup> Osim toga, udio proteina u chia sjemenkama veći je nego u žitarica, ne sadrže gluten i nije zabilježena prisutnost antinutrijenata koji bi mogli negativno utjecati na metabolizam i apsorpciju proteina. Sjemenke također sadrže značajan udio prehrambenih vlakana (34,4 g/100 g), viši u odnosu na druge vrste sjemenki, na primjer lanene sjemenke. Prehrambena vlakna omogućuju stvaranje polisaharidnog omotača oko sjemenki u vodenom mediju, što prilikom konzumacije pospješuje crijevnu peristaltiku. Uz prisutnost navedenih makronutrijenata, važno je naglasiti kako su chia sjemenke dobar izvor mikronutrijenata, prvenstveno antioksidansa, vitamina (pretežno vitamina B skupine) i minerala.

---

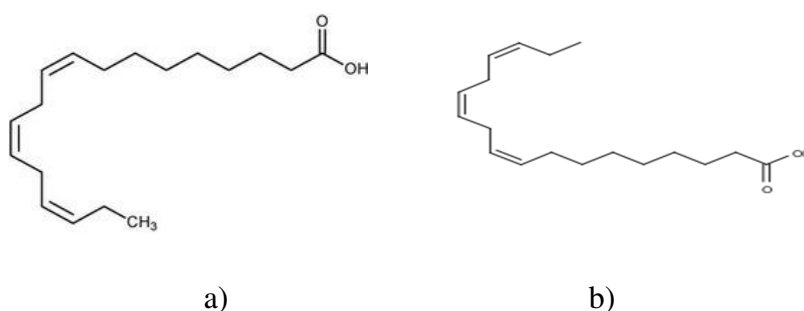
<sup>1</sup>  $\omega$ -3 masne kiseline su posebna skupina unutar nezasićenih masnih kiselina, pripadaju esencijalnim nutrijentima

**Tablica 1.** Kemijski sastav chia sjemenki

<b>Nutritivni sastav</b>	<b>Na 100 g namirnice</b>	<b>Na 15g namirnice</b>
<b>Energija</b>	486 kcal	73 kcal
<b>Voda</b>	5,8 g	0,9 g
<b>Proteini</b>	16,5 g	2,5 g
<b>Masti</b>	30,7 g	4,6 g
- zasićene masne kiseline	3,3 g	0,5 g
-jednostruko nezasićene masne kiseline	2,3 g	0,3 g
- višestruko nezasićene masne kiseline	23,7 g	3,6 g
- trans masne kiseline	0,1 g	0,02 g
<b>Ugljikohidrati</b>	42,1 g	6,3 g
<b>Vlakna</b>	34.4 g	5.2 g

### 1.3.1. Lipidi

Chia sjemenke postale su iznimno zanimljive znanstvenicima nakon što se 1975. godine počela istraživati esencijalnost  $\alpha$ -linolenske masne kiseline u ljudskoj prehrani. Dvije esencijalne masne kiseline su linolna (LA) ( $\omega$ -6) i  $\alpha$ -linolenska (ALA) ( $\omega$ -3). To su višestruko nezasićene masne kiseline koje sadrže 18 ugljikovih atoma, kod kojih je prva dvostruka veza prisutna na trećem ( $\omega$ -3), odnosno šestom ( $\omega$ -6) atomu ugljika brojeno od metilnog kraja. Desaturacijom i elongacijom linolne masne kiseline u organizmu nastaje dugolančana arahidonska masna kiselina, odnosno iz  $\alpha$ -linolenske eikosapentaenska (EPA) i dokosaheksaenska (DHA).



**Slika 2.** Strukture: a)  $\alpha$ -linolenske kiseline (ALA) i  
b) linolne kiseline (LA)

Udio masnih kiselina u chia sjemenkama može znatno varirati ovisno o području uzgoja, a najčešće udio ulja kreće se od 26-35%. Ljudski organizam ne može sintetizirati navedene esencijalne masne kiseline te je stoga potreban njihov unos hranom. Približan omjer  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3-masnih kiselina u današnjoj prehrani ljudi iznosi 15:1 što je iznimno visok omjer. Smanjenjem omjera barem na 4:1 umanjuje se stopa smrtnosti od kroničnih nezaraznih bolesti za 70%. **Udio  $\omega$ -6-masnih kiselina** u ljudskoj prehrani nije problematičan (nalazi se u suncokretovom i sojinom ulju). **Unos  $\omega$ -3-masnih kiselina** često je nedostatan, a kao najvažniji prehrambeni izvori često se navode orasi, lanene sjemenke, ulje konoplje te chia sjemenke. U usporedbi s ostalim sjemenkama moglo bi se reći kako chia sjemenke imaju gotovo idealan **omjer  $\omega$ -6 i  $\omega$ -3-masnih kiselina**, uz lanene sjemenke koje sadrže nešto **veći udio  $\omega$ -3-masnih kiselina** u odnosu na chia sjemenke.

Ono što je karakteristično za chia sjemenke jest visok udio  $\alpha$ -linolenske masne kiseline, međutim iako su podložne djelovanju slobodnih radikala koji mogu imati negativan utjecaj na kvalitetu sjemenki, antioksidansi prisutni u chia sjemenkama sprječavaju njihovo djelovanje, stoga neće doći do nepoželjnih reakcija oksidacije. Danas se sve više istražuje prisutnost fitosterola<sup>2</sup> u chia sjemenkama. Smatra se kako fitosteroli smanjuju apsorpciju kolesterola zbog kompeticije apsorpcije prilikom uključivanja u micele. To rezultira smanjenjem LDL kolesterola koji utječe na nastanak bolesti krvožilnog sustava, a smatra se kako je najvažniji fitosterol  $\beta$ -sitosterol, koji je prisutan i u chia sjemenkama.<sup>4</sup>

### 1.3.2. Proteini

Udio proteina u chia sjemenkama varira od 15-23%, što je veći udio u odnosu na ostale žitarice koje sadrže manje od 16% proteina, poput pšenice, riže, kukuruza i ječma.<sup>4</sup> Udio proteina također ovisi o mjestu uzgoja biljke te se pokazalo kako povišenje temperature utječe na smanjenje količine proteina u sjemenci.<sup>5</sup> Aminokiselinski profil proteina koje sadrže chia sjemenke također je bolji u odnosu na ostale žitarice koje imaju nekoliko limitirajućih aminokiselina, a udio esencijalnih aminokiselina u proteinima chia sjemenki iznosi 41,8-42,8%. Aminokiseline najviše zastupljene u chia sjemenkama su glutaminska kiselina (3,5 g/100 g sjemenke), arginin (2,1 g/100 g sjemenki) i asparaginska kiselina (1,7 g/100 g sjemenke)<sup>1</sup>.

### 1.3.3. Vlakna

Chia sjemenke sadrže visok udio vlakana, najčešće između 34 i 40 g na 100 g sjemenke, što u potpunosti zadovoljava preporuke za unos vlakana<sup>4</sup>. Omjer topljivih i netopljivih prehrambenih vlakana bitno utječe na fiziološke učinke namirnice u organizmu. Prevladavaju netopljiva prehrambena vlakna čiji se udio kreće od 23 do 46%, a udio topljivih vlakana varira od 2,5 do 7,1%.<sup>7</sup> Netopljiva vlakna ubrzavaju

---

<sup>2</sup> Fitosteroli su biološki aktivni steroidni alkoholi biljnog podrijetla, a svojom strukturom vrlo su slični kolesterolu koji je prirodno prisutan isključivo u namirnicama životinjskog podrijetla.

probavne procese, potiču crijevnu peristaltiku, povećavaju fekalnu masu čime olakšavaju prolaz stolice, a topljiva vlakna utječu na smanjenje krvnog tlaka te usporavaju prolaz hrane probavnim sustavom. Osim toga, topljiva vlakna zbog sposobnosti vezanja vode utječu na omekšavanje stolice u debelom crijevu, zbog čega mogu biti korisna kod konstipacije te također imaju sposobnost vezanja žučnih soli čime se smanjuje razina kolesterola u krvi. Od netopljivih prehranbenih vlakana najviše ima lignina<sup>3</sup> koji čini 39-41% ukupnih vlakana.<sup>8</sup> Uz lignin prisutni su i celuloza i hemiceluloza, ali u nižim postocima. Topljiva vlakna utječu na stvaranje polisaharidnog omotača oko sjemenke zbog svoje velike sposobnosti apsorpcije vode, a upravo funkcionalna svojstva vlakana najviše utječu na mogućnosti primjene chia sjemenki u prehrambenoj industriji.

#### **1.3.4. Antioksidansi**

Jedan od najbitnijih sastojaka chia sjemenki upravo su antioksidansi. Antioksidansi su tvari koje usporavaju ili sprječavaju nepoželjne reakcije oksidacije drugih tvari uzrokovane djelovanjem slobodnih radikala<sup>4</sup> u našem organizmu. Slobodni radikali stvaraju se u tijelu u normalnim fiziološkim procesima dobivanja energije u stanicama, a posljedica su loših životnih navika i rezultat su vanjskih čimbenika (npr. stres, UV-zračenje, zagađeni zrak). Antioksidansi neutraliziraju slobodne radikale, a da pritom sami ostaju stabilni, sprječavaju pojavu lančane reakcije slobodnih radikala i popravljaju oštećenja u stanici nastala njihovim djelovanjem. Ukoliko dođe do prekomjernog stvaranja slobodnih radikala, a nedostatnog unosa antioksidansa u organizam, dolazi do pomaka ravnoteže staničnih reakcija u smjeru oksidacije (oksidacijski stres). Posljedica toga su stanična oštećenja, smrt stanica, razne bolesti i oštećenja tkiva. Iz tog razloga iznimno je bitno unositi antioksidanse u organizam putem konzumacije namirnica bogatih antioksidansima ili putem dodataka prehrani.

---

<sup>3</sup> Lignin je fenilpropil alkohola i kiselina te se smatra kako zbog svoje čvrstoće štiti nezasićene masne kiseline prisutne u sjemenkama od oksidacije, a uz to je i antioksidans.

<sup>4</sup> Slobodni radikali su čestice koje sadrže nespareni elektron, te su stoga vrlo reaktivni jer nastoje postići ravnotežno stanje sparivanjem elektrona.

Najzastupljeniji antioksidansi prisutni u chia sjemenkama spadaju u skupine fenolnih kiselina i flavonoida (najviše su zastupljeni flavonoli kemferol, kvercetin i miricetin). Od fenolnih kiselina u najvećem udjelu prisutne su klorogenska (ester kava-kiseline i kumarinske kiseline) i kava-kiselina (hidroksicimetna kiselina). One štite stanice od oksidacijskog stresa te sprječavaju oksidaciju proteina, masti i DNA potaknutu slobodnim radikalima.<sup>4</sup>

### 1.3.5. Vitamini i minerali

Chia sjemenke najviše sadrže **vitamine B skupine**, i to posebno niacin (8,83 mg/100 g). Niacina u chia sjemenkama ima više nego li u kukuruza, soji i riži, a udio tiamina i riboflavina sličan je kao kod riže i kukuruza. Vitamini B skupine bitni su jer su uključeni u metabolizam energije u našem organizmu, a osim njih prisutni su i antioksidacijski vitamini (vitamin C, A i E), ali u manjim udjelima. Iz Tablice 3 se vidi kako chia sjemenke imaju puno bolji mineralni sastav u odnosu na vitaminski, sadrže šest puta više kalcija, jedanaest puta više fosfora te četiri puta više kalija u odnosu na mlijeko.<sup>4</sup> Osim toga, sadrže značajan udio magnezija, željeza i cinka, a udio željeza šest je puta veći u odnosu na špinat. Upravo zbog ovakvog mineralnog sastava chia sjemenke predstavljaju odličan izvor mikronutrijenata za sportaše, kojima su navedeni minerali iznimno bitni za oporavak mišića i izdržljivosti.

**Tablica 2.** Udio vitamina i minerala u chia sjemenkama<sup>1</sup>

<b>Minerali</b>	<b>Na 100 g</b>	<b>Vitamini</b>	<b>Na 100 g</b>
<b>Kalcij, Ca</b>	632 mg	<b>Vitamin A</b>	54 IU
<b>Željezo, Fe</b>	7,72 mg	<b>Vitamin E</b>	0,50 mg
<b>Magnezij, Mg</b>	335 mg	<b>Vitamin C</b>	1,60 mg
<b>Fosfor, P</b>	860 mg	<b>Tiamin</b>	0,62 mg
<b>Kalij, K</b>	407 mg	<b>Riboflavin</b>	0,17 mg
<b>Natrij, Na</b>	16 mg	<b>Niacin</b>	8,83 mg
<b>Zink, Zn</b>	4,58 mg		

## **1.4. Fizikalno-kemijska svojstva chia sjemenki**

Kako bi se odredila funkcionalna svojstva proteina chia sjemenki često se provodi postupak denaturacije kojim se utječe i na njihovu probavljivost. Utvrđeno je da proteinski izolat chia sjemenki ima jako dobar kapacitet vezanja vode (engl. Water-holdingcapacity, WHC) u iznosu od 4,06 g/g te odličan kapacitet vezanja ulja (engl. Oil-holdingcapacity, OHC) u iznosu od 4,04 g/g. Osim toga, proteinski izolati pokazali su se termički vrlo stabilni te do denaturacije globulina dolazi tek pri otprilike 125°C, što ih čini frakcijom s najvećom toplinskom stabilnošću.<sup>6</sup> Također, frakcija bogata proteinima izolirana iz chia sjemenki pokazala je sposobnost stvaranja emulzija u vrijednosti od 50-56% neovisno o pH vrijednosti, a stabilnost emulzije iznosila je 92% pri višem pH (pH=8 i pH=10). Osim toga, pokazalo se kako dodatkom glicerola ili sorbitola, proteini chia sjemenki imaju sposobnost stvarati čvrste filmove. Takvi filmovi imaju jako dobra svojstva u odnosu na sintetske filmove i slabo propuštaju kisik što je iznimno bitno u očuvanju kvalitete proizvoda. Također se pokazalo kako bi se zahvaljujući sposobnosti stvaranja gelaste strukture, chia sjemenke mogle koristiti u prehrambenoj industriji kao hidrokoloid<sup>5</sup>. Zbog velikog udjela vlakana koje sadrže imaju sposobnost upijanja vode i do 12 puta više u odnosu na njihovu masu, stvarajući gelastu strukturu.

## **2. Uporaba chia sjemenki u industriji**

### **2.1. Prehrambena industrija**

Iako su chia sjemenke tradicionalna hrana u pojedinim dijelovima svijeta, na području Europske unije ubrajaju se u novu hranu budući da se nisu u značajnoj mjeri koristile za prehranu ljudi prije 1997. godine. Nakon što je 2009. godine Europska komisija odobrila uporabu chia sjemenki u proizvodnji kruha, a kasnije je odobren i zahtjev za proširenje proizvoda u koje se smiju dodavati, opseg proizvoda koji sadrže chia sjemenke postao je sve veći, a samim time i njihova potražnja je znatno porasla. Danas su na tržištu Europske Unije, ali i diljem svijeta prisutni brojni proizvodi koji u

---

<sup>5</sup> Hidrokoloidi su polimerni spojevi velikih molarnih masa, koji otopljeni ili dispergirani u vodi mijenjaju njena fizikalna svojstva.



svom sastavu sadrže chia sjemenke, poput kruha i ostalih pekarskih proizvoda, tortilja, čokolada, jogurta, voćnih sokova, žitarica za doručak i slično.

Ono što ide u prilog proizvodima koji sadrže chia sjemenke, odnosno samim chia sjemenkama, jest činjenica da ne sadrže česte alergene koji su prisutni u prehrambenim proizvodima, jaja i mlijeko, a osim toga ne sadrže gluten zbog čega su izvrstan izbor u prehrani osoba koje boluju od celijakije. Osim toga, chia sjemenke predstavljaju dobar izvor proteina i vlakana te imaju dobar vitaminsko-mineralni sastav, što ih čini poželjnom namirnicom u prehrani vegana i vegetarijanaca. Sve navedeno osigurava chia sjemenkama velik potencijal u prehrambenoj industriji.



**Slika 3.** Proizvodi sa Chia sjemenkama (Cedevita<sup>29</sup>, kruh<sup>30</sup>, zobena kaša<sup>31</sup>)

Chia sjemenke se također mogu dodavati i u smjese za ishranu životinja namijenjenih za ljudsku prehranu, čime se smanjuje udio kolesterola, a povećava udio  $\omega$ -3-masnih kiselina u mesu peradi i jajima.

Iako su studije na ljudima još uvijek limitirane i nema dovoljno dokaza koji bi u potpunosti potvrdili djelovanje chia sjemenki na ljudski organizam, dosad provedene studije pripisuju pozitivna svojstva. U preglednom radu koji je proučavao povijesnu uporabu chia sjemenki te dosad provedene studije na životinjama i ljudima zaključeno je kako djeluju antiupalno te mogu pozitivno utjecati na alergije, anginu, sportsku izvedbu, rak, celijakiju, zatvor, bolesti krvožilnog sustava, hipertenziju, dijabetes tipa II, hiperlipidemiju, upale, srčani udar, hormonalne disfunkcije, pretilost i ostalo.<sup>13</sup>

## 2.2. Farmaceutska industrija

Pogodna je za korištenje u kozmetici (njega kose i kože) zbog visokog udjela  $\alpha$ -linolenske kiseline koja pomaže u održavanju optimalne vlažnosti uz sprječavanja isušivanja i ljuštenja. Također je klasični sastojak za anti-age formulacije i proizvode za osjetljivu kožu i dermatitis. Ulje chia sjemenki učinkovito je i u uklanjanju ožiljaka, crvenila te toniranju lica zbog čega je često korišten proizvod prije hidratacije lica.



**Slika 4.** Ulje chia sjemenki<sup>32</sup>

### **3. Pregled korištenih metoda**

#### **3.1. Metode izolacije**

##### **3.1.1. Ekstrakcija**

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topljivost u različitim otapalima. Bilo da se radi o ekstrakciji iz tekuće ili iz čvrste faze, organsko otapalo koje se primjenjuje za ekstrakciju treba zadovoljiti sljedeće uvjete:

- otapalo mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima,
- tvar koju ekstrahiramo mora imati što bolju topljivost u tom otapalu,
- otopina iz koje se ekstrahira željena tvar i otapalo moraju se što više razlikovati u gustoći,
- otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se, nakon ekstrakcije, moglo lako ukloniti,
- otapalo mora biti što manje zapaljivo, neotrovno i jeftino.

Otapala koja se najčešće koriste za ekstrakciju u organskom laboratoriju su: dietil-eter, kloroform, petroleter, diklormetan itd.<sup>14</sup>

Za vrijeme ekstrakcije odvija se prijenos mase, tj. otopljene tvari prelaze iz materijala (u ovom slučaju biljnog materijala) u otapalo. Prijenos mase odvija se u tri stupnja:

1. željena komponenta se otapa u otapalu,
2. smjesa otopljene tvari i otapala prelazi iz materijala na površinu,
3. otopljena tvar se raspršuje u volumenu otapala.

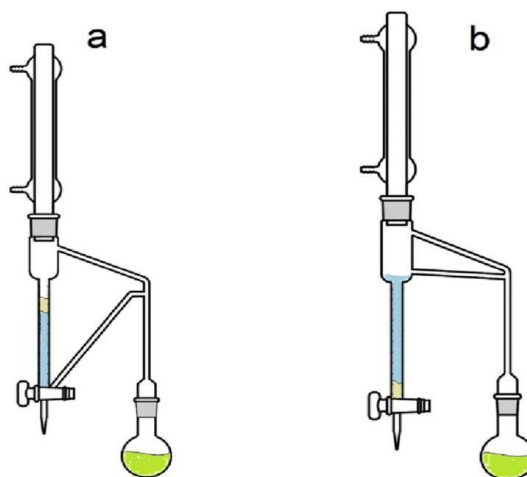
### 3.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija jednostavan je postupak koji uključuje uporabu zvučnih valova kako bi se ekstrahirao uzorak uronjen u organskom otapalu. Ultrazvuk je po definiciji zvuk iznad gornje granice čujnosti za normalno ljudsko uho, to jest frekvencije titraja iznad 20 kHz.

Ultrazvučne kupelji se često koriste u laboratorijima jer su lako dostupne i relativno jeftine. Obično su elementi pretvornika smješteni na dnu spremnika te oni prenose vibracije direktno tekućini koja je u spremniku. Prednosti postupka ultrazvučne ekstrakcije su njena relativna brzina, jednostavnost, smanjenje čestica, ubrzani prijenos mase tvari i to što ne zahtijeva skupe instrumente, a nedostaci veliki volumen otapala i moguća potreba višekratne ekstrakcije. Ekstrakti se nakon završene ekstrakcije moraju filtrirati.<sup>22</sup>

### 3.1.3. Hidrodestilacija u modificiranoj aparaturi po Clevengeru

Hidrodestilacija (engl. *hydrodistillation*; HD) se najčešće koristi za izolaciju eteričnih ulja. Usitnjeni biljni materijal se postavlja u tikvicu s vodom koja se zagrijava do ključanja (najčešće na atmosferskom tlaku). Pare eteričnog ulja i vode se kondenziraju u hladilu i sakupljaju u središnjem dijelu aparature. Postoje različite izvedbe aparature, a među ostalim se mogu razlikovati ovisno da li se koriste za izolaciju eteričnih ulja lakših ili težih od vode (Slika 5.). Poslije separacije ulja, ulje sadrži manje ili više otopljene ili emulgirane vode, koja se može ukloniti standardnim sredstvima za sušenje kao što su bezvodni  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ili  $\text{MgSO}_4$ . Osušeno ulje se sprema u dobro zatvorene staklene ili aluminijske posude na hladnom i tamnom mjestu. Kondenzacijska voda u kojoj je zaostao (otopljen i/ili emulgiran) dio komponenti ulja naziva se hidrosol (engl. *hydrosol*) i također se upotrebljava u kozmetičkoj i parfumerijskoj industriji.



**Slika 5.** Aparatura prema Clevengeru<sup>33</sup> s nastavcima za destilaciju eteričnih ulja: a - za ulja veće gustoće od vode, b - za ulja manje gustoće od vode. Na vrh nastavka postavlja se hladilo, a na bočnu cijev nastavka postavlja se tikvica s biljnim materijalom i vodom.

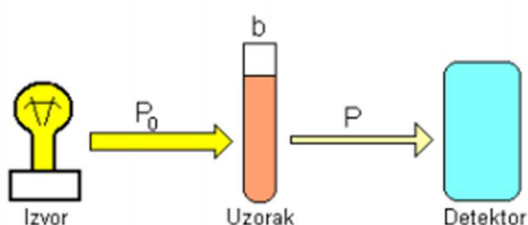
### 3.2. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrija je tehnika kojom se mjeri transmittancija emitiranog elektromagnetskog zračenja kroz ispitivani uzorak, tj. apsorbancija tog istog uzorka pri određenoj valnoj duljini (Slika 6.). Uređaj za mjerenje apsorbancije naziva se *spektrofotometar*.

*Transmitancija (T)* otopine definira se kao dio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu:

$$T = \frac{P}{P_0}$$

gdje je  $P_0$  ulazna snaga snopa svjetlosti, a  $P$  snaga snopa svjetlosti nakon apsorpcije.



**Slika 6 .** Prigušivanje snopa zračenja kao rezultat apsorpcije u otopini<sup>21</sup>

Apsorbancija ( $A$ ) se definira jednačom:

$$A = -\log_{10} T = -\log \frac{P}{P_0} = \log \frac{P_0}{P}$$

Funkcijski odnos između apsorbancije ( $A$ ) i koncentracije ( $c$ ) poznat je kao **Beerov zakon**:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = a \cdot b \cdot c$$

gdje je  $a$  konstanta proporcionalnosti-apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent),  $b$  duljina puta zračenja kroz uzorak, a  $c$  je koncentracija apsorbirajuće vrste. Budući da je apsorbancija veličina bez dimenzija, jedinice za apsorpcijski koeficijent određuju se uz pretpostavku da je lijeva strana jednačbe bezdimenzijska.<sup>21</sup>

### 3.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola primjenom Folin-Ciocalteu metode

Folin-Ciocalteu metoda je spektrofotometrijska metoda koja se temelji na oksidaciji fenolnih skupina do kinona dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa (FC) te nastajanju plavo obojenog produkta.

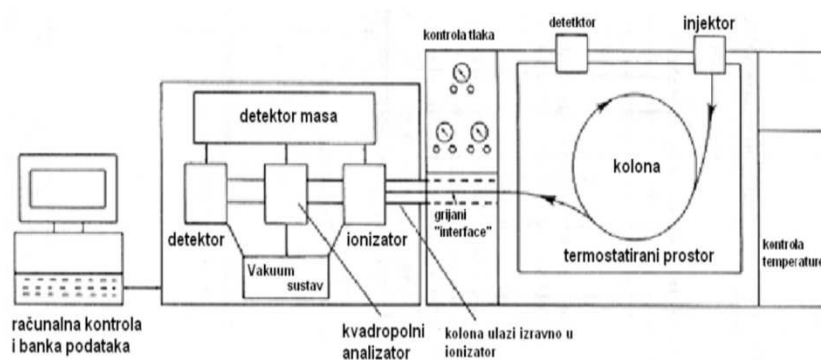
FC reagens je žuto obojena smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline koja ne sadrži fenole. Potpuna kemijska priroda reakcije nije poznata, ali se smatra da dolazi do heteropolifosfovolframat molibdat redukcijskih reakcija reverzibilnih izmjena jednog ili dva elektrona što dovodi do nastanka obojenih spojeva, s maksimalnom apsorpcijom pri valnoj duljini od 765 nm. Fenolni spojevi reagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom pod uvjetom da je pH otopine 10, što se postiže dodatkom  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Pri toj pH vrijednosti fenoli disociraju proton i prelaze u fenolat anion, koji je potom sposoban reducirati FC reagens.

Na osnovu izmjerene apsorbancije uzorka iz prethodno načinjene baždarnе krivulje očita se sadržaj ukupnih fenola u ispitivanom uzorku. Baždarna se krivulja dobiva mjerenjem apsorbancije uzorka različitih koncentracija galne kiseline u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom.

Unatoč nedovoljno razjašnjenjоj kemijskoj prirodi FC metoda je pouzdana, jednostavna i ponovljiva za određivanje fenolnih antioksidansa.

### 3.2.2. Plinska kromatografija-masena spektrometrija

Velike mogućnosti u plinsko-kromatografskoj analizi eteričnih ulja stvorene su povezivanjem plinskog kromatografa sa spektrometrom masa kao detektorom (Slika 7.). Ove dvije metode su komplementarne, a njihovom kombinacijom se može postići osjetljivost tehnike u redu pikogramskih i femtogramskih količina tvari (1 pikogram =  $10^{-12}$  g; 1 femtogram =  $10^{-15}$  g). Važan čimbenik u radu ovog vezanog sustava je brzina snimanja spektara masa, budući odjeljene komponente ulaze u detektor masa jedna za drugom. Četveropolni (kvadropolni) analizatori u spektrometru masa omogućavaju brzo snimanje spektara (nekoliko milisekundi).



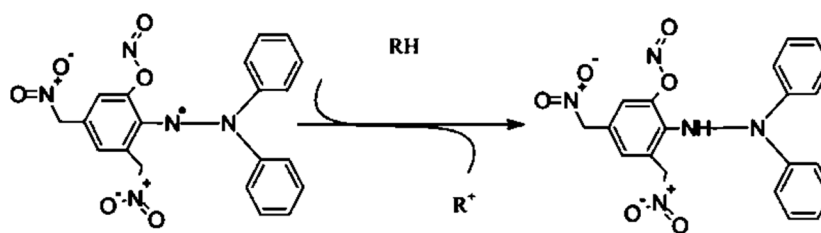
**Slika 7.** Shema vezanog sustava GC-MS<sup>22</sup>

Kao rezultat analize u spektrometru masa dobije se spektar masa s odnosom intenziteta i omjera mase i naboja ( $m/z$ ) nastalih fragmenata.

Način fragmentiranja u spektrima masa organskih spojeva u bliskoj je vezi s kidanjem veza u njihovim kemijskim reakcijama. Tumačenje načina fragmentiranja važno je za dokazivanje strukture spoja. Molekulski ion teži fragmentiranju, a način fragmentiranja često ovisi o stabilnosti nastalih karbokationa. Za poznate spojeve, čiji su spektri masa pohranjeni u računalnoj banci podataka, snimljeni spektri se uspoređuju s bankom podataka te računalo određuje postotak slaganja spektara, a time i pouzdanost identifikacije.<sup>22</sup>

### 3.2.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzorka metodom vezivanja DPPH radikala

Metoda hvatanja slobodnih 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH) jedna je od najčešće korištenih metoda za određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i temelji se na sposobnosti ekstrakta da smanji aktivnost DPPH radikala. Ne ovisi o polarnosti antioksidansa, već samo o njegovoj strukturi. Mehanizam reakcije DPPH radikala je prikazan na slici 8.



Slika 8. Mehanizam reakcije DPPH radikala s antioksidansom<sup>18</sup>

Alkoholna otopina DPPH• se reducira u prisutnosti antioksidansa i pri tome dolazi do nastanka neradikalnog oblika (DPPH-H). Ova se metoda temelji na redukciji stabilnog radikala DPPH•, koji radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Sparivanjem elektronskog para stabilnog radikala DPPH• u prisutnosti elektron donora (antioksidans, koji hvata slobodne radikale), ljubičasta se boja mijenja u žutu. Nastali spoj ima smanjeni intenzitet apsorpcije u vidljivom dijelu spektra, a nastalo obezbojenje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona.<sup>18</sup>

Redukcija se prati smanjenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 517 nm i moguće je mjerenjem vrijednosti apsorbancije odrediti postotak redukcije DPPH• sljedećim izrazom:

$$\% \text{ redukcije} = (A_K - A_A / A_K) \times 100$$

gdje je  $A_A$  apsorbancija otopine s dodanim antioksidansom (mjerena 1 sat nakon dodatka), a  $A_K$  je apsorbancija čiste otopine (kontrolni uzorak).

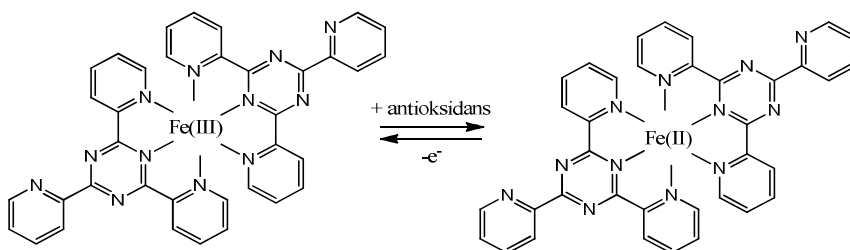
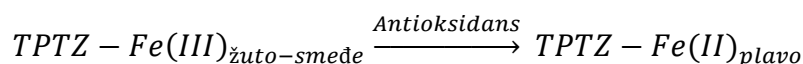


### 3.2.4. Metoda mjerenja redukcijskog potencijala

FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power* – *antioksidacijska moć redukcije željeza*) metoda je jednostavna i brza, indirektna metoda mjerenja ukupnog redukcijskog potencijala. Temelji se na redukciji  $\text{Fe}^{3+}$  iona u  $\text{Fe}^{2+}$  ion u prisutnosti antioksidansa, a mehanizam djelovanja FRAP reakcije je prikazan na slici 9.

FRAP metoda je kolorimetrijski temeljena na redoks sustavu gdje se neenzimski antioksidansi (npr. vitamin C, bioflavonoidi) koriste kao reducensi.

Nastali  $\text{Fe}^{2+}$  ioni u prisutnosti 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ reagens) tvore stabilni kompleks, koji apsorbira pri 593 nm i nastaje plavo obojenje čiji intenzitet ovisi o količini antioksidansa u uzorku. Reakcija se odvija u kiselom mediju ( $\text{pH} = 3,6$ ).<sup>19</sup>

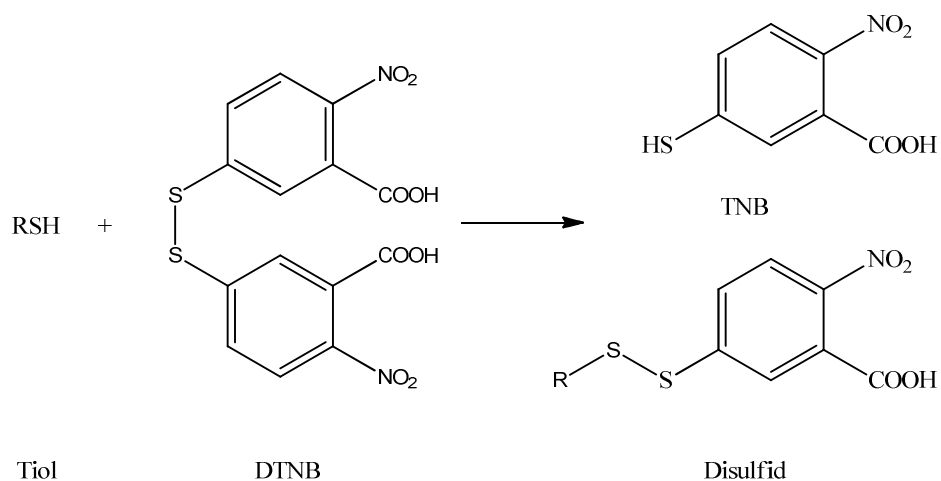


Slika 9. Mehanizam djelovanja FRAP reakcije<sup>20</sup>

### 3.2.5. Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze metodom po Ellmanu

Ellmanova metoda je jednostavna spektrofotometrijska metoda koja se koristi za mjerenje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE). Metoda se temelji na reakciji Ellmanovog reagensa, DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina)) s tiolnim skupinama supstrata koji nastaje djelovanjem AChE i BChE. Reakcijom nastaje 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB), koja dalje u vodi ionizira u  $\text{TNB}^-$  anion kod neutralnog ili alkalnog pH (Slika 9.). Oslobođeni  $\text{TNB}^-$  ion ima intenzivno žutu boju.

Metoda po Ellmanu je brza metoda kod koje se dodatkom jednog mola tiola oslobađa jedan mol  $\text{TNB}^-$ . Apsorpcijski maksimum DTNB-a je pri valnoj duljini od 320 nm, dok se količina oslobođenog  $\text{TNB}^-$  mjeri pri duljini od 412 nm.<sup>18</sup>



**Slika 10.** Ellmanova reakcija za određivanje tiola<sup>18</sup>

Sposobnost inhibicije enzima računa se prema izrazu:

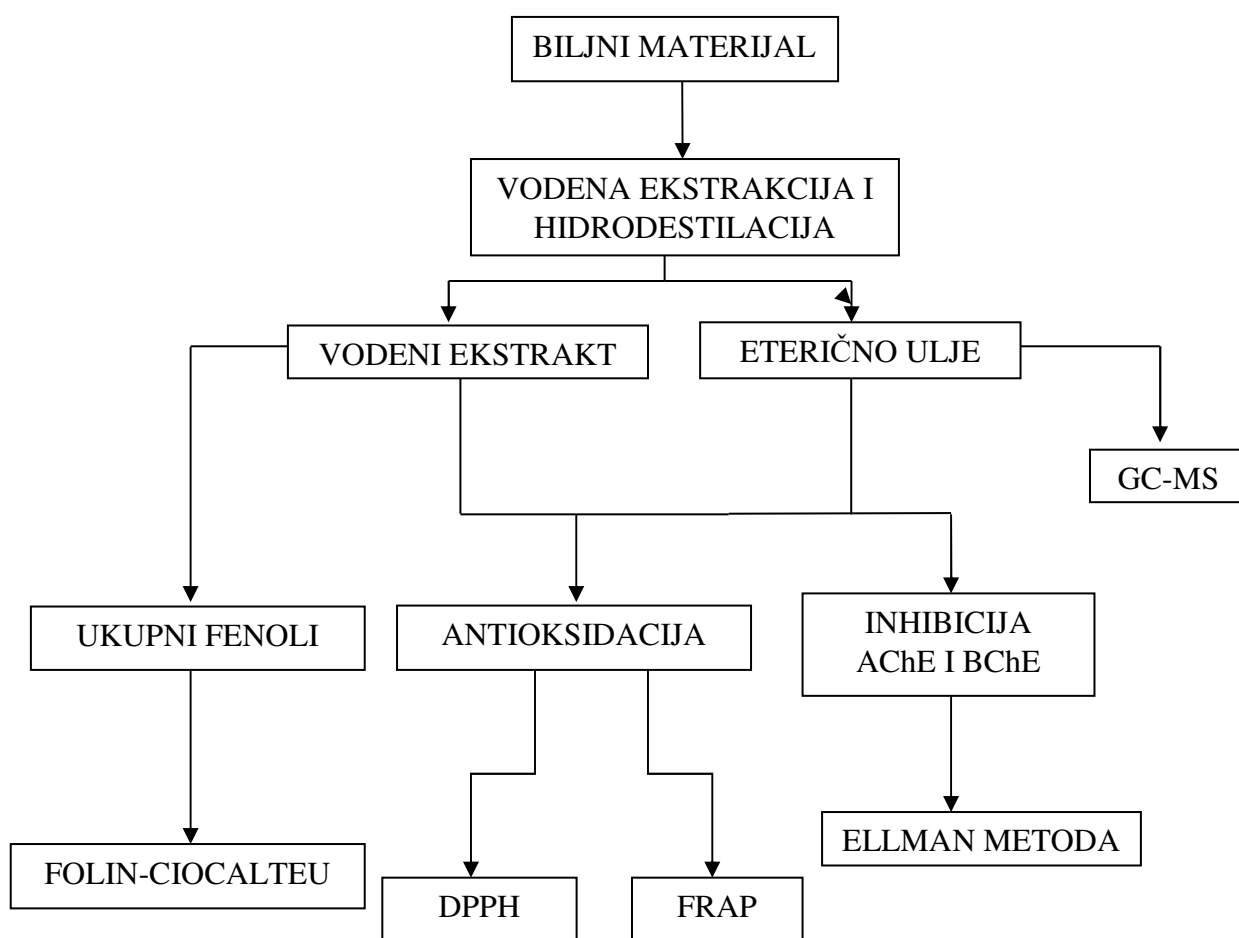
$$\% \text{ inhibicije AChE(ili BuChE)} = (A_K - A_A / A_K) \times 100$$

gdje je  $A_A$  apsorbancija test otopine, a  $A_K$  je apsorbancija kontrolnog uzorka.

## 4. Eksperimentalni dio

### 4.1. Biljni materijal

Chia sjemenke su podrijetlom iz Bolivije. Biljni materijal podvrgnut je ekstrakciji s vodenim otapalom u svrhu dobivanja vodenog ekstrakta i hidrodestilaciji u modificiranoj aparaturi po Clevengeru u svrhu dobivanja eteričnog ulja. Na slici 11. prikazana je shema pripreve i analize biljnog materijala chia sjemenki (*Salvia hispanica* L.).



**Slika 11.** Shema pripreve i analize biljnih izolata

## 4.2. Aparatura i pribor

- digitalna vaga: Kern ALS 120-4
- ultrazvučna kupelj: Bandelin Sonorex RK 103 H
- centrifuga: Nuve 1200R
- čitač mikrotitarskih pločica: Tecan SUNRISE
- mikrotitarske pločice (96 jažica)
- automatske mikropipete
- staklena čaša
- tikvica s okruglim dnom
- povratno hladilo
- rotacijski vakuum uparivač
- lijevak za filtraciju
- Erlenmeyerova tikvica
- modificirani Clevenger aprat
- kalota za zagrijavanje
- plinski kromatograf (Varian Inc., Lake Forest, CA, SAD) s plamenoionizacijskim detektorom (FID)
- maseni spektrometar (MS) model 2100T (Varian Inc.)
- napolarna kolona VF-5MS (dimenzije: 30 m dužine, unutrašnji promjer 0,25 mm i debljine nepokretne faze 0,25  $\mu\text{m}$ )

### **4.3. Priprema vodenog ekstrakta biljke**

U tikvicu s okruglim dnom stavljeno je 25 g usitnjenog biljnog materijala te je dodano oko 100 mL vode. Tikvica je uronjena u ultrazvučnu kupelj, spojena na povratno hladilo i smjesa je refluksirana 2 sata na temperaturi od 75°C. Dobiveni ekstrakt je filtriran dva puta i nakon toga dobivena tekućina je uparena do suha u rotacijskom vakuum uparivaču. Zaostali talog u tikvici je otopljen u vodi i centrifugiran. Otopina je za daljnje analize čuvana u hermetički zatvorenoj bočici u hladnjaku na temperaturi od 4°C. Vodeni ekstrakt je liofiliziran i dobiven kao prah koji se kasnije pripremao u odgovarajućim koncentracijama.

### **4.4. Hidrodestilacija u modificiranoj aparaturi po Clevengeru**

U tikvicu se odvaži 50 g suhog biljnog materijala i doda 500-1000 mL destilirane vode (cijeli biljni materijal uronjen u vodu). Tikvica se spoji na Clevenger nastavak, a hladilo postavi iznad nastavka. Središnja cijev aparature po Clevengeru se ispuni destiliranom vodom sve do početka prelijevanja vode u bočnu cijev nastavka. U središnju cijev aparature doda se smjesa pentana (5 mL) i dietil-etera (2,5 mL) kao "trap" ili "zamka" za hvatanje eteričnog ulja. Voda za hlađenje se pusti kroz nastavak po Clevengeru i hladilo, a tikvica s biljnim materijalom se zagrijava preko kalote do ključanja vode. Postupak traje 3 sata.

#### 4.5. Priprema otopina potrebnih koncentracija

Masa ekstrakta nakon uparivanja dobivena je iz razlike mase tikvice poslije uklanjanja otapala (tikvice s talogom) i mase prazne tikvice. Masena koncentracija uzorka određena je pomoću izraza:

$$\gamma (\text{uzorka}) = \frac{m (\text{uzorka})}{V (\text{otapala})}$$

Dobivena koncentracija vodenog ekstrakta iznosi 5 mg/mL. Otopina te koncentracije dalje je razrijeđena kako bi se dobile niže koncentracije (4 mg/mL, 3 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL) potrebne za provođenje analiza, a dobivena koncentracija eteričnog ulja iznosi 0,4 mg/mL. U tablici 3. prikazane su konačne koncentracije uzorka korištene za pojedinu metodu.

**Tablica 3.** Početne koncentracije uzorka za pojedinu metodu

<i>Metode</i>  <i>Početne koncentracije</i>	<b>Folin-Ciocalteu</b>	<b>DPPH</b>	<b>FRAP</b>	<b>Ellman</b>
<b>Vodeni Ekstrakt</b>	5 mg/mL 4 mg/mL 3 mg/mL 2 mg/mL 1 mg/mL	5 mg/mL 1 mg/ml 0,5 mg/mL	5 mg/mL 1 mg/ml 0,5 mg/mL	5 mg/mL 1 mg/ml 0,5 mg/mL
<b>Eterično ulje</b>	0,4 mg/mL	0,4 mg/mL	0,4 mg/mL	0,4 mg/mL

#### 4.6. Određivanje ukupnih fenola po Folin-Ciocalteu

*Priprava reagensa:*

- *Folin- Ciocalteu fenol reagens*
- *otopina natrijevog karbonata*, w ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) = 20 %: 200 g bezvodnog natrijevog karbonata otopi se u 1L vode, uz kuhanje; otopina se nakon 24 h filtrira
- *matična otopina standarda (galne kiseline)*, c ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ) = 100-1000 mg/L

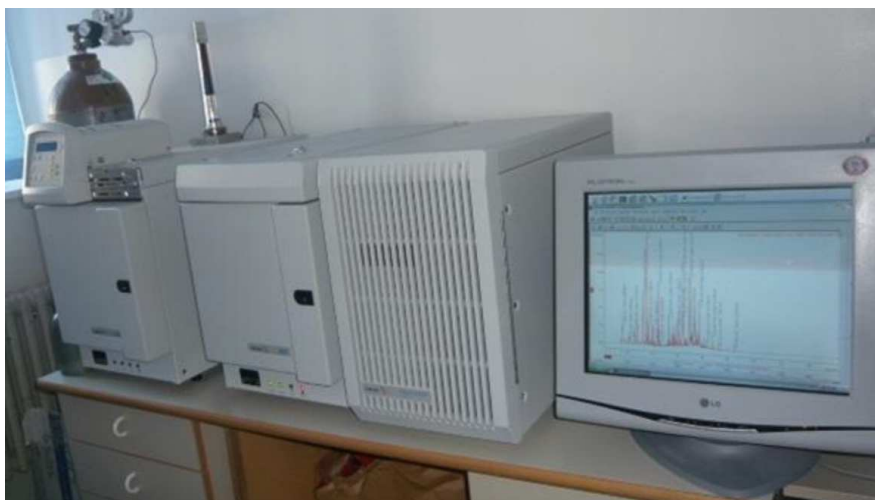
*Postupak:*

U kivetu od 4 mL otpipetira se 25  $\mu\text{L}$  prethodno razrijeđenog uzorka, odnosno vodenog ekstrakta biljke, doda se 1,975  $\mu\text{L}$  destilirane vode i 125  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reagensa. Otopina se promiješa i nakon par minuta doda joj se 375  $\mu\text{L}$  20% otopine natrijevog karbonata. Referentna otopina je pripravljena od 125  $\mu\text{L}$  FC reagensa, 1,975  $\mu\text{L}$  destilirane vode i 375  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Otopine se ostave stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega im se na spektrofotometru izmjeri apsorbancija pri 765 nm. Sadržaj fenolnih spojeva računa se preko jednadžbe baždarnog pravca, a rezultati se izražavaju u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po 1,0 g ekstrakta (mg GAE/g).

#### 4.7. Određivanje kemijskog sastava eteričnog ulja spregnutom tehnikom plinska kromatografija-masena spektrometrija

Kvalitativna i kvantitativna analiza kemijskog sastava eteričnih ulja određivana je tehnikom plinske kromatografije i spregnutom tehnikom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). Za analize eteričnih ulja korišteni suplinski kromatograf model 3900 s masenim spektrometrom (MS) model 2100T, nepolarnom kolonom VF-5MS (dimenzije: 30 m dužine, unutarnji promjer 0,25 mm i debljina nepokretne faze 0,25  $\mu\text{m}$ ). Temperaturni program za kolonu VF-5MS je postavljen na način da je početna temperatura bila 60°C, izotermno postavljena 3 minute, nakon čega je povećavana do 246°C brzinom 3°C/minute nakon toga postavljena izotermno 25 minuta. Ostali kromatografski uvjeti su kako slijedi: plin nositelj je bio helij; brzina protoka je bila 1 mL/min; injekcijski blok je bio namješten na 250°C; volumen analiziranog uzorka je bio 1,0  $\mu\text{L}$ ; omjer raspodjele je bio 1:50; temperatura FID-a je bila 300°C. Uvjeti MS-a

bili su sljedeći: ionizacijski potencijal je bio 70 eV; temperatura ionskog izvora je bila 200°C; raspon masa za pretraživanje bio je od 40-350 masenih jedinica.



**Slika 12.** Vezani sustav GC-MS

Pojedini pikovi su određeni usporedbom njihovih vremena zadržavanja (u odnosu na standardnu seriju n-alkana C<sub>8</sub>-C<sub>30</sub> za kolone VF-5MS s onim iz "kućne" baze podataka, literature<sup>24</sup> i/ili vremenima zadržavanja komercijalnih standarda. Maseni spektri pojedinih pikova su također uspoređivani s komercijalnim bazama podataka: Wiley 7 MS (Wiley, New York, SAD) i NIST02 (Gaithersburg, MD, SAD), "kućnom" bazom podataka te literaturom.<sup>24</sup> "Kućna" baza podataka (vremena zadržavanja i masenih spektara) načinjena je korištenjem komercijalnih standarda čistih spojeva i od glavnih sastojaka mnogih eteričnih ulja dobivenih u prijašnjim istraživanjima. Kvantitativni sastav pojedinih sastojakaje izračunat kao srednja vrijednost površine pojedinog pika tri GC-MS analize.



#### 4.8. Određivanje antioksidacijske aktivnosti vezivanjem slobodnog radikala DPPH metodom

*Priprava reagensa:*

U tikvici je otopljeno 4 mg 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u 96% etanolu.

*Postupak:*

U kivete širine 1 cm je stavljeno po 1 mL DPPH otopine i dodano po 50  $\mu$ L uzorka vodenog ekstrakta različitih koncentracija (5 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL) i eteričnog ulja koncentracije 0,4 mg/mL, te je sve dobro promiješano. U trajanju od 1 sata mjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm. Mjerena je i apsorbancija referentne otopine (DPPH).

Redukcija se prati smanjenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 517 nm odnosno promjenom boje od ljubičaste na početku reakcije do žute i moguće je mjerenjem vrijednosti apsorbancije odrediti postotak redukcije DPPH.

#### 4.9. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

*Priprava reagensa:*

1. *Acetatni pufer*; 0,3 M, pH=3,6:

- pomiješano je 3,1 g natrij-acetata trihidrata ( $C_2H_3NaO_2 \times 3H_2O$ ) i 16 mL glacijalne octene kiseline ( $C_2H_4O_2$ ) i nadopunjeno destiliranom vodom do potrebnog volumena od 1 L.

2. *Otopina TPTZ-a:*

- pripremljena je 10 mM otopina 2,4,6,tripiridil-s-triazina u 40 mM HCl-u: otopljeno je 0,031 g TPTZ-a u 10 mL 40 mM otopine HCl-a

3. *Otopina ( $FeCl_3 \times 6H_2O$ ):*

- otopljeno je 0,054 g željezovog(III) klorida u destiliranoj vodi i nadopunjeno do 10 mL.

4. *Standard:*

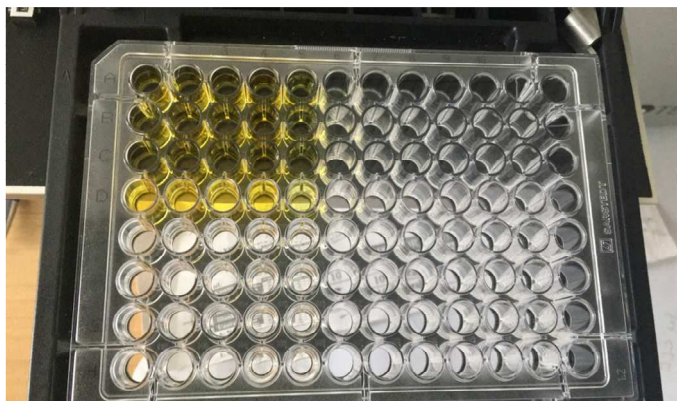
- otopina standarda pripravljena je otapanjem 0,0056 g ( $FeSO_4 \times 7H_2O$ ) u 10 mL destilirane vode.

#### 5. *FRAP reagens:*

- pomiješano je 25 mL acetatnog pufera s 2,5 mL otopine TPTZ-a i 2,5 mL otopine željezo(III) klorida heksahidrata.

#### *Postupak:*

Slijepa proba se pripravi miješanjem 225  $\mu\text{L}$  FRAP reagensa bez TPTZ i 7,5  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ . U mikrotitarskoj pločici sa 96 jažica (Slika 13.) je stavljeno po 225  $\mu\text{L}$  svježe pripravljenog FRAP reagensa i 7,5  $\mu\text{L}$  uzorka (ili 7,5  $\mu\text{L}$  destilirane vode za slijepu probu), mogućeg antioksidansa, ili standarda za ostala mjerenja. Praćena je promjena apsorpcije pri valnoj duljini od 593 nm. Mjerenje je trajalo 4 minute počevši od trenutka kada je dodan uzorak koji se mjerio te se stvorilo plavo obojenje koje ima apsorpcijski maksimum kod 593 nm.



**Slika 13.** Mikrotitarska pločica sa 96 jažica (autor: K. Krejčir)

### **4.10. Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima AChE i BChE metodom po Ellmanu**

#### *Kemikalije:*

1. *enzim acetilkolinesteraza (Tip V-S, iz elektrofora električne jegulje)*
2. *acetiltiokolin jodid (ATChI)*
3. *5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) – DTNB*
4. *enzim butirilkolinesteraza*
5. *S-butiriltiokolin jodid (S-BTChI)*

U tablici 4. je prikazana priprava kemikalija za rad dok je u tablici 5. prikazana shema otopina korištenih u eksperimentu.

**Tablica 4.** Priprava kemikalija za rad

Kemikalije	Osnovna otopina	Konačna koncentracija	Volumen/ $\mu\text{L}$
<b>Pufer</b>			190 $\mu\text{L}$
<b>DTNB</b>	13,079 mg u 5 mL pufera (pH=7)	0,3 mM	10 $\mu\text{L}$
<b>ATChI</b>	15,9 mg u 5 mL pufera (pH=8)	0,5 mM	10 $\mu\text{L}$
<b>AChE</b>	6,6 $\mu\text{L}$ u 5 mL pufera (pH=8)	0,03 U/mL	10 $\mu\text{L}$
<b>S-BTChI</b>	17,45 mg u 5 mL pufera (pH=8)	0,5 mM	10 $\mu\text{L}$
<b>BChE</b>	14 $\mu\text{L}$ u 5 mL pufera (pH=8)	0,03 U/mL	10 $\mu\text{L}$

*Postupak:*

**Tablica 5.** Shema otopina u eksperimentu

	Kontrola	BL <sub>1</sub>	BL <sub>2</sub>	Uzorak M	Uzorak BL
<b>Pufer</b>	190	200	200	180	190
<b>DTNB</b>	10	10	10	10	10
<b>Uzorak</b>	/	/	/	10	10
<b>AChE</b>	10	/	10	10	/
<b>ATChI</b>	10	10	/	10	10
<b>BChE</b>	10	/	10	10	/
<b>S-BTChI</b>	10	10	/	10	10

U svakoj jažici reakcijska smjesa sadrži:

- 180  $\mu\text{L}$  0,1 mol/L fosfatnog pufera pH=8,
- 10  $\mu\text{L}$  5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeve kiseline) DTNB-a, čija koncentracija u smjesi iznosi 0,3 mmol/L (početna otopina pripremljena u 0,1 mol/L fosfatnom puferu pH=7 s dodatkom 0,12 mol/L natrij-bikarbonata, radi stabilnosti DTNB-a),
- 10  $\mu\text{L}$  acetilkolinesteraze (AChE) (ili S-butirilkolinesteraze (BChE)), čija koncentracija u smjesi iznosi 0,03 U/mL,
- 10  $\mu\text{L}$  acetiltiokolin jodida - ATChI (ili S-BTChI) , čija koncentracija u smjesi iznosi 0,5 mmol/L (početne otopine za AChE i ATChI (za BChE i S-BTChI) pripremljene su koristeći 0,1 mol/L fosfatni pufer pH=8),
- 10  $\mu\text{L}$  uzoraka određene koncentracije otopljenog u etanolu ili samog etanola u slučaju kontrolnog mjerenja,

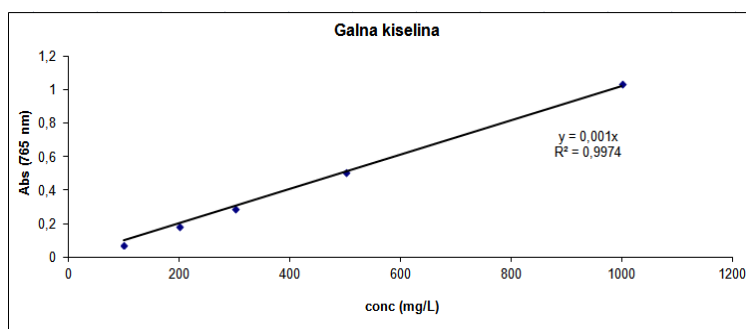
Uzorci se otpipetiraju u jažice, prema shemi iz tablice 5. s time da se supstrat, ATChI dodaje neposredno prije početka mjerenja budući da on započinje reakciju. Neenzimska hidroliza praćena je tzv. "blank" mjerenjima, odnosno slijepim probama. U jednoj slijepoj probi izostavljena je AChE, a u drugoj ATChI koji se zamijeni jednakim volumenom pufera.

Mjerenje se vršilo na višekanalnom čitaču mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan, GmbH, Austrija) uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka na računalo.

## 5. Rezultati

### 5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola primjenom Folin-Ciocalteu metode

Za izradu baždarnog pravca, pripravljene su otopine standarda, galne kiseline koncentracije 100-1000 mg/L, koje su ispitane prema prethodno opisanom postupku (poglavlje 4.6.). Iz dobivenih podataka izradi se baždarni pravac s vrijednostima koncentracije standarda na apscisi i vrijednostima apsorbancije na ordinati (slika 14.). Tablica 6. prikazuje sadržaj ukupnih fenola vodenog ekstrakta Chia sjemenki (*Salvia hispanica* L.) dobivenih iz baždarnog pravca.

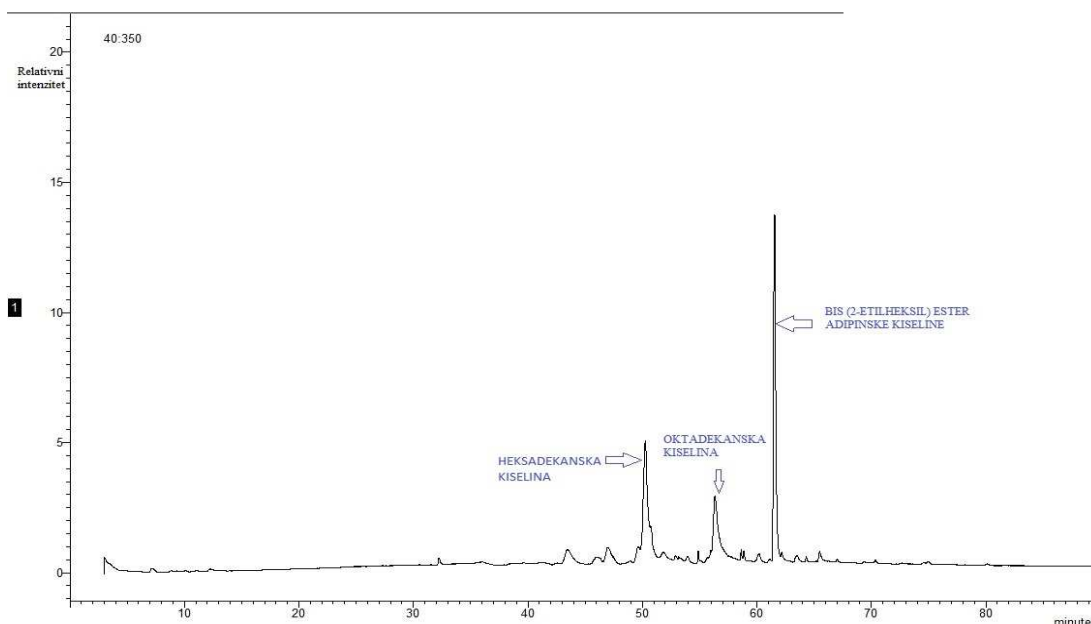


Slika 14. Baždarni pravac standarda (galne kiseline) za određivanje ukupnih fenola

Tablica 6. Sadržaj ukupnih fenola u vodenom ekstraktu biljke

Početne koncentracije	Ukupni fenoli (mg GAE/g ekstrakta)
5 mg/mL	231
4 mg/mL	152
3 mg/mL	138
2 mg/mL	109
1 mg/mL	85

## 5.2. Određivanje kemijskog sastava eteričnog ulja spregnutom tehnikom plinska kromatografija-masena spektrometrija



Slika 15. Kromatogram chia sjemenki (*Salvia hispanica* L.)

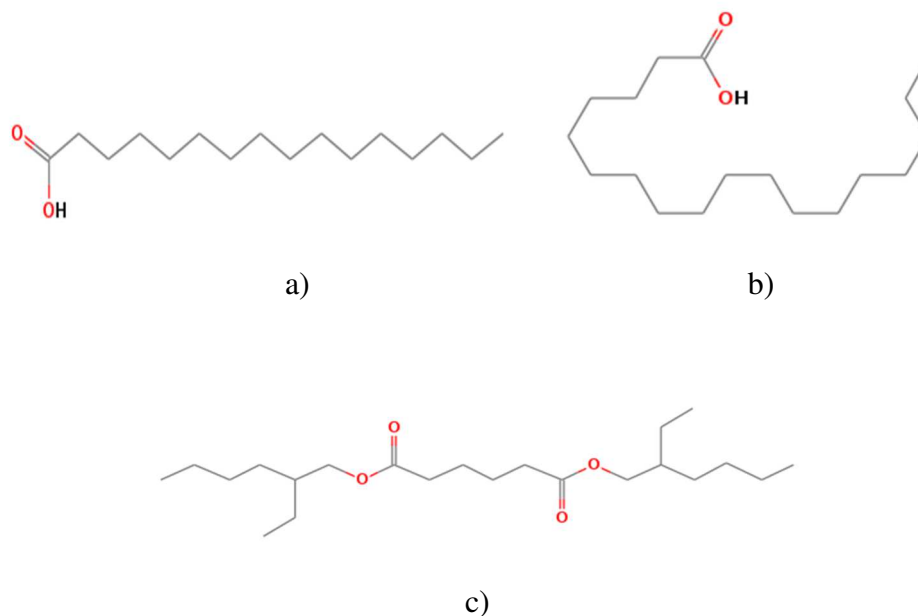
Korištenjem GC-MS metode identifikacije spojeva izvučena su i indentificirana 3 najizraženija pika i indentificirali ih (Tablica 7.):

Tablica 7. Rezultati GC-MS analize eteričnog ulja chia sjemenki

R. br.	R <sub>t</sub> / min	%	KI	Naziv spoja	Ni
1.	50,236	23,7	1972	Heksadekanska kiselina	MS, KI, st
2.	56,342	14,8	2168	Oktadekanska kiselina	MS, KI, st
3.	61,554	58,5	2350	Bis(2-etilheksil) ester adipinske kiseline	MS, KI
		97,0			

R. br. - redni broj, R<sub>t</sub>- vrijeme zadržavanja na koloni VF-5ms, % - maseni udio u eteričnom ulju, KI - Kovatsevi indeksi za kolonu VF-5ms, Ni - način indentifikacije: MS - identifikacija pomoću komercijalne baze masenih spektara NIST02 i Wiley 7, St -

identifikacija potvrđena komercijalnim standardom, KI - identifikacija potvrđena Kovatsevim indeksima



**Slika 16.** Kemijska struktura: a) heksadekanska kiselina; b) oktadekanska kiselina; c) bis(2-etilheksil) ester adipinske kiseline

### 5.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzorka DPPH metodom

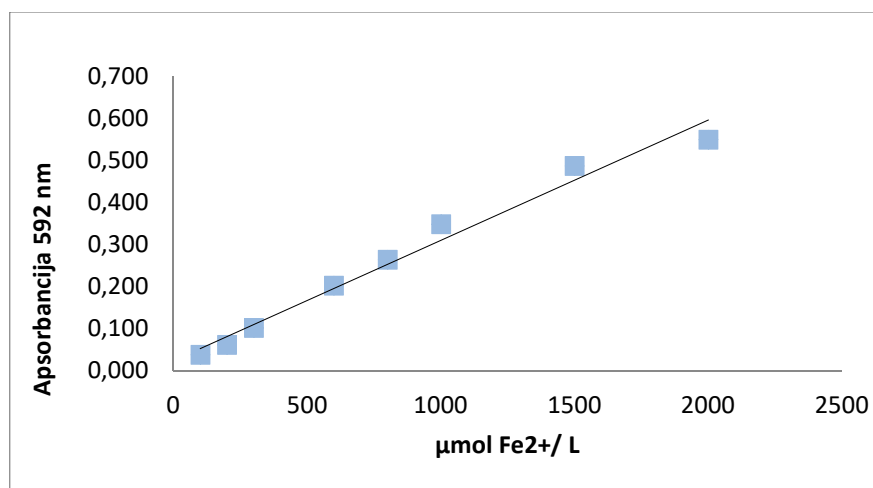
Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti vodenog ekstrakta biljke chia sjemenki (*Salvia hispanica* L.) su prikazani u tablici 8.

**Tablica 8.** Rezultati antioksidacijske aktivnosti mjereni DPPH metodom

Vodeni ekstrakt ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inhibicija DPPH radikala (%)
238	66,95
48	30,76

#### 5.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzorka FRAP metodom

Na slici 17. je prikazana standardna krivulja za FRAP metodu koja služi za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti vodenog ekstrakta chia sjemenki (*Salvia hispanica* L.) FRAP metodom su prikazani u tablici 9.



Slika 17. Standardna krivulja za FRAP metodu

Tablica 9. Rezultati antioksidacijske aktivnosti mjereni FRAP metodom

Uzorak (μg/mL)	FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> / L)
Vodeni ekstrakt	
161	2185,42
32	519,58
16	342,08
Eterično ulje	
13	225,42



### **5.5. Sposobnost inhibicije enzima AChE mjerena metodom po Ellmanu**

Metodom po Ellmanu ispitana je sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze vodenim ekstraktom chia sjemenki i eteričnim uljem. Ispitivane su serije uzoraka različitih početnih koncentracija (vodeni ekstrakt = 5 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, eterično ulje = 0,4 mg/mL). Niti jedan od uzoraka nije pokazao sposobnost inhibicije enzima AChE.

### **5.6. Sposobnost inhibicije enzima BChE mjerena metodom po Ellmanu**

Metodom po Ellmanu ispitana je sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze vodenim ekstraktom chia sjemenki i eteričnim uljem. Ispitivane su serije uzoraka različitih početnih koncentracija (vodeni ekstrakt = 5 mg/mL, 1 mg/mL, eterično ulje = 0,4 mg/mL). Niti jedan od uzoraka vodenog ekstrakta nije pokazao sposobnost inhibicije enzima BChE. Uzorak eteričnog ulja (0,4 mg/mL) pokazao je sposobnost inhibicije enzima **BChE** u vrijednosti od **22,46 %**.

## 6. Rasprava

Cilj ovog rada je bio odrediti sadržaj ukupnih fenola vodenog ekstrakta i sastav eteričnog ulja chia sjemenki (*Salvia hispanica* L.) te ispitati antioksidacijska svojstva i potencijalne sposobnosti inhibicije enzima AChE i BChE vodenog ekstrakta i eteričnoga ulja.

Sadržaj ukupnih fenola određen je primjenom Folin-Ciocalteu metode, a indentifikacija spojeva eteričnog ulja odrađena je GC-MS metodom. Antioksidacijska aktivnost je ispitana metodama hvatanja slobodnih radikala (DPPH) i mjerenjem redukcijskog potencijala (FRAP), dok je sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE određena metodom po Ellmanu.

Ispitivanjem sadržaja ukupnih fenolnih spojeva na uzorcima vodenog ekstrakta utvrđeno je za početne koncentracije: 5 mg/mL 231 mg GAE/g ekstrakta, 4 mg/mL 152 mg GAE/g ekstrakta, 3 mg/mL 138 mg GAE/g ekstrakta, 2 mg/mL 109 mg GAE/g ekstrakta i 1 mg/mL 85 mg GAE/g ekstrakta.

Iz masenog spektrometra dobivenog GC-MS metodom izdvojena su 3 najizraženija pika, a zatim su identificirani spojevi. Najveći maseni udio u eteričnom ulju (58,5%) ima bis(2-etilheksil) ester adipinske kiseline u retencijskom vremenu od 61,554 min., zatim 23,7% ima heksadekanska kiselina u retencijskom vremenu od 50,236 min, a najmanji udio u eteričnom ulju (14,8%) ima oktadekanska kiselina u retencijskom vremenu od 56,342 min.

Mjerenja antioksidacijske aktivnosti pomoću DPPH metode su provedena za različite serije koncentracija u sustavu vodenog ekstrakta (238 µg/mL, 48 µg/mL i 24 µg/mL) i eteričnog ulja (19 µg/mL). Najveća inhibicija postignuta je kod uzorka koncentracije 5 mg/mL (koncentracija u sustavu 238 µg/mL) u iznosu od 66,95%. Uzorak koncentracije 1 mg/mL (koncentracija u sustavu 48 µg/mL) pokazuje inhibiciju od 30,76%. Na temelju rezultata može se zaključiti da se postotak inhibicije DPPH radikala smanjuje proporcionalno sa smanjenjem koncentracije uzorka.

Redukcijski potencijal vodenog ekstrakta biljke određen je FRAP metodom. Mjerenjem promjene apsorbancije ( $\Delta A$ ) izračunate su vrijednosti koncentracija nastalog  $\text{Fe}^{2+}$ , koje su proporcionalne koncentracijama antioksidansa. Uzorak koncentracije u sustavu 161  $\mu\text{g/mL}$  pokazuje najveću redukcijsku sposobnost s vrijednošću od 2815,42  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ , uzorak od 32  $\mu\text{g/mL}$  pokazuje redukcijsku sposobnost u iznosu od 519,58  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ , 16  $\mu\text{g/mL}$  pokazuje vrijednost od 342,08  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$  te uzorak eteričnog ulja koncentracije u sustavu 13  $\mu\text{g/mL}$  pokazuje najmanju redukcijsku sposobnost s vrijednošću od 225,42  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L}$ .

Metodom po Ellmanu ispitana je sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE. Za mjerenje su korišteni uzorci vodenog ekstrakta koncentracija u sustavu 227  $\mu\text{g/mL}$ , 46  $\mu\text{g/mL}$  i 23  $\mu\text{g/mL}$  te eteričnog ulja 18  $\mu\text{g/mL}$ . Niti jedan od uzoraka nije pokazao sposobnost inhibicije enzima AChE. Niti jedan od uzoraka vodenog ekstrakta nije pokazao sposobnost inhibicije enzima BChE. Uzorak eteričnog ulja početne koncentracije 0,4 mg/mL (18  $\mu\text{g/mL}$  u sustavu) pokazao je sposobnost inhibicije enzima BChE u vrijednosti od 22,46%.

Dobiveni rezultati ukazuju na posjedovanje relativno dobre antioksidacijske aktivnosti vodenog ekstrakta i eteričnog ulja biljke. Ispitivanjem inhibicijske sposobnosti vodenog ekstrakta na enzime AChE i BChE metodom po Ellmanu nije došlo do inhibicije enzima, iz čega se može zaključiti kako chia sjemenke nisu inhibitor enzima AChE i BChE. Ispitivanjem inhibicijske sposobnosti eteričnog ulja na enzim BChE metodom po Ellmanu došlo je do inhibicije enzima u vrijednosti od 22,46%.

## 7. Zaključak

- U ovom eksperimentalnom radu, analizama je dokazana relativno dobra antioksidacijska aktivnost vodenog ekstrakta i eteričnog ulja biljke. Rezultati ispitivanja inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) su pokazali da niti jedan ispitivani uzorak nije inhibirao enzim. Rezultati ispitivanja inhibicije enzima butirilkolinesteraze (BChE) pokazali su da samo uzorak eteričnog ulja biljke inhibira enzim.
- Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva iznosi za vodeni ekstrakt početnih koncentracija 5 mg/mL 231 mg GAE/g ekstrakta, 4 mg/mL 152 mg GAE/g ekstrakta, 3 mg/mL 138 mg GAE/g ekstrakta, 2 mg/mL 109 mg GAE/g ekstrakt i 1 mg/mL 85 mg GAE/g ekstrakta.
- Najizraženiji pik odnosno najveći maseni udio u eteričnom ulju (58,5%) ima bis(2-etilheksil) ester adipinske kiseline u retencijskom vremenu od 61,554 min., zatim 23,7% ima heksadekanska kiselina u retencijskom vremenu 50,236 min, a najmanji udio u eteričnom ulju (14,8%) ima oktadekanska kiselina u retencijskom vremenu od 56,342 min.
- DPPH metodom je utvrđeno da najveću inhibiciju postiže vodeni ekstrakt pri početnoj koncentraciji 5 mg/mL (koncentracije u sustavu 238 µg/mL) s 66,95 % inhibicije DPPH radikala. Smanjenjem koncentracije vodenog ekstrakta (1 mg/mL, koncentracije u sustavu 48 µg/mL) dolazi do znatnijeg smanjenja inhibicije DPPH radikala (30,76%).
- FRAP metodom određen je antioksidacijski kapacitet uzorka vodenog ekstrakta za različite serije početnih koncentracija 5 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL (koncentracija u sustavu 161 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL) te je utvrđeno da najbolju antioksidacijsku aktivnost ima uzorak pri 5 mg/mL u iznosu od 2815,42 µmola Fe<sup>2+</sup>/L.

- Metodom po Ellmanu se ispitivala sposobnost inhibicije enzima AChE vodenim ekstraktom i eteričnim uljem biljke. Ispitivani ekstrakt nije pokazao sposobnost inhibicije enzima.
- Metodom po Ellmanu se ispitivala sposobnost inhibicije enzima BChE vodenim ekstraktom i eteričnim uljem biljke. Ispitivani vodeni ekstrakt nije pokazao sposobnost inhibicije enzima. Eterično ulje biljke početne koncentracije 0,4 mg/mL (koncentracije u sustavu 18 µg/mL) pokazalo je sposobnost inhibicije enzima u vrijednosti od 22,46%.

## 8. Literatura

1. USDA - United States Department of Agriculture, *The PLANT Database* (2017) <https://plants.sc.egov.usda.gov/core/profile?symbol=SAHI6>. (3.3.2017.)
2. S. S. Edwards, *Botanical registrar* **5** (1819) 359.
3. CBI, Ministry of Foreign Affairs, CBI - Centre for the Promotion of Imports (2017) <https://www.cbi.eu/market-information/oilseeds/chia-seeds/europe/>. (3.3.2018.)
4. L. A. Muñoz, A. Cobos, O. Diaz, J. M. Aguilera J., *Journal of Food Engineering* **108** (2012) 216-224.
5. R. Ayerza, *Journal of the American Oil* **87** (2010) 1161-1165.
6. B. L. Olivos-Lugo, M. Á. Valdivia-López, A. Tecante, *Food Science and Technology International* **16** (2010) 89-96.
7. S. Suri, S.J. Passi, J. Goyat, *Chia Seed (Salvia hispanica L.) – A new age functional food*, 4th International Conference on Recent Innovations in Science Engineering and Management (2016) str. 752-760.
8. E. Reyes-Caudillo, A. Tecante, M. A. Valdivia-López, *Food Chemistry* **107** (2008) 656-663.
9. O. Martínez-Cruz, O. Paredes-López, *Journal of Chromatography A* **1346** (2014) 43-48.
10. S.C. Oliveira-Alves, D. B. Vendramini-Costa, C. B. Betim Cazarin, M. R. Maróstica Júnior, J. P. Borges Ferreira, A. B. Silva, M. A. Prado, M. R. Bronze, *Characterization of phenolic compounds in chia (Salvia hispanica L.) seeds, fiber flour and oil*, *Food Chemistry* (2017) <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617305629?via%3Dihub>. (23.3.2018.)
11. V. Lelas, *Procesi pripreme hrane*, Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb (2008) str. 61.
12. R. Coorey, A. Tjoe, V. Jayasena, *Journal of Food Science* **79** (2014) 859-866.
13. C. Ulbricht, W. Chao, K. Nummy, E. Rusie, S. Tanguay-Colucci, C. M. Iannuzzi, J. B. Plammoottil, M. Varghese, W. Weissner, *Reviews on Recent Clinical Trials* **4** (2009) 168-174.

14. M. I. Capitani, L. J. Corzo-Rios, L. A. Chel-Guerrero, D. A. Betancur-Ancona, S. M. Nolasco, M. C. Tomás, *Journal of Food Engineering* **149** (2015) 70-79.
15. F. Burčul, *Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae*, Doktorska disertacija, University of Zagreb, Zagreb (2014)
16. EFSA (European Food Safety Authority), *The EFSA Journal* **278** (2005) 1-12.
17. I. Kuraica, *Funkcionalna svojstva chia sjemenki*, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu (2017)
18. G. L. Ellman, D. K. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone, *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*, *Biochem. Pharmacol.* **7** (1961) str. 88-95.
19. I. F. F. Benzie, J. J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measure of "antioxidant power": The FRAP assay*, *Analytical Biochem.* **239** (1996) str. 70-76.
20. A. Đulović, *Usporedba dviju metoda za određivanje inhibicijske sposobnosti na kolinesteraze*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split (2014)
21. L. Kukoč-Modun, *Molekulska apsorpcijska spektrofotometrija*, Laboratorijska vježba (2003)
22. M. Brnčić, B. Tripalo, A. Penava, D. Karlović, D. Ježek, D. Vikić Topić, S. Karlović, T. Bosiljkov, *Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane*, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, Vol. 4 No. 1-2, Zagreb, 2009, str. 32-37
23. I. Jerković, *Kemija i tehnologija aromatičnog bilja*, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2016, str. 88-92.
24. R. P. Adams, *Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry*, 4th Ed., Allured publishing corporation: Carol Stream, IL, USA (2007)
25. <https://www.floandgrace.com/201128meet-mr-chia-html/> (15.6.2018.)
26. J. P. Cahill, *Ethnobotany of chia, Salvia hispanica L. (Lamiaceae)*, *Economic Botany.* **57** (2003) str. 604-618

27. A. Sosa, G. Ruiz, J. Rana, G. Gordillo, H. West, M. Sharma, X. Liu, R. R. R. Torre, *Journal of Crop Research and Fertilizers* **1** (2016) 1-9
28. <https://www.google.com/search?q=salvia+hispanica+L.+flower&tbm=isch&tbu=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwiSrPzdwf7bAhWFKlAKHfnaC3AQsAQILQ&biw=1366&bih=631#imgsrc=lbJlBHW8RkX6M>: ( 24.3.2018.)
29. [https://www.google.com/search?q=proizvodi+sa+chia+sjemenkama&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwijtJmIw\\_7bAhXIaVAKHU1CA4AQ\\_AUICigB&biw=1366&bih=631#imgsrc=JR8VphvVfi9UQM](https://www.google.com/search?q=proizvodi+sa+chia+sjemenkama&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwijtJmIw_7bAhXIaVAKHU1CA4AQ_AUICigB&biw=1366&bih=631#imgsrc=JR8VphvVfi9UQM): (24.3.2018.)
30. [https://www.google.com/search?client=firefox-b-ab&biw=1366&bih=631&tbm=isch&sa=1&ei=Xxw5W\\_zAIJLUwAKkgIeoBQ&q=kruh+sa+chia+sjemenkama&oq=kruh+sa+chia+sjemenkama&gs\\_l=img.3..0i30k1j0i24k114.71975.76392.0.76530.25.12.0.8.8.0.375.2008.2-4j3.7.0....0...1c.1.64.img..10.15.2254.0..0j0i67k1.0.sRbPkfYorOU#imgsrc=Fwn\\_hhxN5SMQ4M](https://www.google.com/search?client=firefox-b-ab&biw=1366&bih=631&tbm=isch&sa=1&ei=Xxw5W_zAIJLUwAKkgIeoBQ&q=kruh+sa+chia+sjemenkama&oq=kruh+sa+chia+sjemenkama&gs_l=img.3..0i30k1j0i24k114.71975.76392.0.76530.25.12.0.8.8.0.375.2008.2-4j3.7.0....0...1c.1.64.img..10.15.2254.0..0j0i67k1.0.sRbPkfYorOU#imgsrc=Fwn_hhxN5SMQ4M): (24.3.2018.)
31. [https://www.google.com/search?client=firefox-b-ab&biw=1366&bih=631&tbm=isch&sa=1&ei=rRw5W-2lKIvdwQKD9bDoBg&q=zobena+ka%C5%A1a+sa+chia+sjemenkama&oq=zobena+ka%C5%A1a+sa+chia+sjemenkama&gs\\_l=img.3...57310.59231.0.59398.12.11.0.0.0.0.279.1704.2-7.7.0....0...1c.1.64.img..8.1.246...0i7i30k1.0.8lsifedDWXc#imgsrc=mjeL0BGTIEYhMM](https://www.google.com/search?client=firefox-b-ab&biw=1366&bih=631&tbm=isch&sa=1&ei=rRw5W-2lKIvdwQKD9bDoBg&q=zobena+ka%C5%A1a+sa+chia+sjemenkama&oq=zobena+ka%C5%A1a+sa+chia+sjemenkama&gs_l=img.3...57310.59231.0.59398.12.11.0.0.0.0.279.1704.2-7.7.0....0...1c.1.64.img..8.1.246...0i7i30k1.0.8lsifedDWXc#imgsrc=mjeL0BGTIEYhMM): (24.3.2018.)
32. [https://www.google.com/search?q=chia+seed+oil&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjd6Jznw\\_7bAhVGLVAKHYP3D3kQ\\_AUICigB&biw=1366&bih=631#imgsrc=rU2krLIyD-S1NM](https://www.google.com/search?q=chia+seed+oil&client=firefox-b-ab&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjd6Jznw_7bAhVGLVAKHYP3D3kQ_AUICigB&biw=1366&bih=631#imgsrc=rU2krLIyD-S1NM): (24.3.2018.)
33. [https://www.google.com/search?client=firefox-b-ab&biw=1366&bih=631&tbm=isch&sa=1&ei=eh05W4D5PIzdwALakJjoBg&q=Clevenger&oq=Clevenger&gs\\_l=img.3..0i19k1110.14358.17914.0.18049.11.10.0.1.1.0.325.1288.0j1j3j1.5.0....0...1c.1.64.img..6.5.1074.0..0.0.FojQ48ex3dU#imgsrc=tCmYMwyyvhKfuM](https://www.google.com/search?client=firefox-b-ab&biw=1366&bih=631&tbm=isch&sa=1&ei=eh05W4D5PIzdwALakJjoBg&q=Clevenger&oq=Clevenger&gs_l=img.3..0i19k1110.14358.17914.0.18049.11.10.0.1.1.0.325.1288.0j1j3j1.5.0....0...1c.1.64.img..6.5.1074.0..0.0.FojQ48ex3dU#imgsrc=tCmYMwyyvhKfuM): (25.5.2018.)